

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE
LOS GENES CCNG2 Y C-MYC”**

Lorena Martínez Gac

Madrid, 2009

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE
LOS GENES CCNG2 Y C-MYC”**

Doctorando: LORENA MARTÍNEZ GAC
Licenciada en Bioquímica

Directores de la tesis:
MIGUEL R. CAMPANERO GARCÍA
ANA C. CARRERA RAMÍREZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS “ALBERTO SOLS”
CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA
(CSIC-UAM)
MADRID

A Oscar

A mis amigos

“Cuando creas que has llegado, comienza”

Anónimo

Agradecimientos

Y después de 2 años, finalmente el momento ha llegado. Ni yo creía que esto iba a ocurrir, pero de pronto me vi con la tesis en las manos y supe que era cierto. Esta tesis se la debo de alguna u otra manera a mucha gente, algunos que estuvieron al principio, otros que han estado ahora, y a los que han estado siempre.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis 2 directores: el Dr. Miguel Campanero y la Dra. Ana Carrera, sin los cuales hoy no estaría escribiendo estas líneas.

A Ana, mi primera directora, por haberme recibido en su laboratorio y haberme apoyado en mis primeros pasos por el mundo de la ciencia, por mi primera publicación y por su disposición en esta etapa final a pesar del laaaaargo tiempo que ha pasado.

A Miguel, mi segundo director, por todo lo que me enseñó en los años que estuve en el 2.4.1 y por su infinita paciencia cuando “metía la pata” con algún experimento y, ahora, después de 2 años desaparecida, por haberme permitido leer la tesis y por haberme tratado como si nunca me hubiera ido. Por las largas horas que ha pasado corrigiendo esta tesis y los consejos pero, sobre todo, por su apoyo incondicional en esta última etapa.

A Carmela Calés e Ignacio Palmero, mi tutor, por todos los buenos consejos y críticas, no solo en los seminarios de grupo, sino cada vez que las he necesitado. A Carmela también me gustaría agradecerle la oportunidad que me brindó de haber participado como ayudante de laboratorio en las prácticas de Bioquímica y a Ignacio, su lectura de la tesis. También quería mencionar a Teresa Iglesias, a la que agradezco sus consejos en “la zona común” del laboratorio y las risas que hacían más ameno el trabajo.

A Ángel, Miriam, Irenita y María, por toda la ayuda que me han brindado durante la escritura de esta tesis. Qué hubiera hecho yo sin ellos.....mis ángeles de la guarda que han estado al otro lado del tel. o del mail cada vez que tenía una duda o un problema. Por su paciencia a prueba de todo pero, principalmente, por demostrarme que son amigos de corazón.

A los que en algún momento fueron mis compis del labo 2.4.1, Irene, María, Jesús, Patri Víctor, Josué y María Cortés, por todos los momentos compartidos en el IIB y su ayuda en el laboratorio pero, sobre todo, por su amistad y todo lo que hemos vivido y seguimos viviendo fuera del Instituto. A todos, por “confiar” en que esta tesis iba a llegar a buen puerto. María se merece un monolito!!!!

A Sergio, Rubén, Ali y Christian por las charlas, las risas, los cafés de media mañana y los consejos de laboratorio y por la amistad que nació en el IIB y que aún sigue.

A las chicas “Perform”: Carmen, Belén, Paloma, Patri, Eva, Rocío, María P. y María S., por su amistad más allá de la oficina y por apoyarme en mi decisión de leer la tesis y darme ánimos y preocuparse por mi en los mails casi diarios. Sentí una gran emoción cuando me dijeron que estaban orgullosas de mí.

A mis compis del CNB, Bea (mi “jefecilla”), Zaira, Carmen, Domingo, Ángel y Ernesto, por ayudarme a comenzar este largo camino y enseñarme a “hacer manos” en el laboratorio.

A Edel, Merche y Aurora y a los chicos del 2.4.2, 1.4.1 y 1.4.2, por las charlas de pasillo o de cultivos y las comidas y celebraciones que hemos compartido.

Al Dr. José Alberto García Sanz, por su paciencia al enseñarme a realizar Northern Blot y sus útiles consejos.

Agradecimientos

Al Dr. José Alcamí y su grupo, por su colaboración en este trabajo.

To Dr. Baniahmad, from Jena. Thank you for receiving me in your lab and for your patience and good advices.

To Asim Siddiki, also from Jena. Thank you for the advices in the lab and the smiles and good Indian food outside! Thank you for keeping this friendship all along these years.

A la gente de los distintos servicios del IIB: a los chicos de informática, Nani y Javi, por haberme sacado de apuros tantas veces con el ordenador; a los chicos de imagen, por toda la ayuda prestada en la impresión de esta tesis (ellos todavía no lo saben, pero les voy a dar trabajo!!!), a Fernando de la biblioteca, por su simpatía diaria y haber puesto su granito de arena en esta tesis (gracias por el espiral!!!); y a Jose que ya no está en el almacén, por las risas que nos hemos echado mientras preparaba los pedidos.

A mis ex compis de piso: a Lorena por todos los papers que me imprimió y las charlas y risas (y no risas) sobre ciencia y a Maíra por las mini-charlas durante los ratos de descanso y en las comidas y por su interés por mí.

A las chicas que ahora está lejos pero que por suerte, a pesar de la distancia, siguen siendo mis amigas: Pepa, Esther y Mariana,

A mi familia que, aunque a la distancia, siempre están allí apoyándome, sobre todo mi mamá que se preocupa siempre demasiado. Y a mi nueva familia, que también siempre están pendientes de cómo voy, pero sobre todo, de cómo estoy.

A mis amigos de Argentina, Pao, Caro y Guille, que me han dado fuerzas desde la distancia.

Y finalmente a Oscar, por haberme apoyado en la decisión de escribir y durante todo el tiempo de escritura, por su paciencia en los momentos difíciles. Por quererme y cuidarme siempre tanto y sobre todo en esos momentos. Esta tesis es para vos.

Resumen/Summary

G0 o quiescencia es un estado de latencia alcanzado por las células cuando son sometidas a condiciones inhibitorias del crecimiento. Tanto la entrada en quiescencia como la salida de ésta son procesos estrechamente controlados. En este trabajo hemos estudiado los mecanismos que regulan la expresión de *Ccng2* (ciclina G2) y *C-MYC*, dos genes involucrados en dichos procesos. Mientras que ciclina G2 es necesaria para mantener el estado de quiescencia, C-MYC es crucial para la progresión hacia y a través de G1. Nuestros resultados muestran la existencia de niveles elevados de expresión de ciclina G2 en células quiescentes y una reducción considerable de éstos dependiente de PI3K cuando las células salen de G0. FoxO3a, un factor de transcripción cuya actividad está negativamente regulada por PI3K, se une al promotor del gen *Ccng2* y lo activa. Además, la inhibición de la transcripción mediada por FoxO, mediante sobre-expresión de una forma inactiva del mismo, disminuye la expresión de *Ccng2*. Estos resultados demuestran que los factores FoxO regulan la expresión de *Ccng2*. En cuanto a *C-MYC*, si bien su promotor tiene un sitio de unión a E2F, este gen es capaz de escapar al efecto represivo de los complejos E2F/RB durante la salida de G0. Hemos descubierto un factor nuclear (EMYCS) que se une a un sitio que solapa con el elemento E2F de este promotor y tiene un peso molecular estimado de 105 kDa. Esta proteína no se corresponde con ningún factor E2F u otro factor de transcripción que se conozca que interaccione con el elemento E2F del promotor de *C-MYC*. EMYCS tiene capacidad activadora de la transcripción y nuestros resultados sugieren que es necesario para activar la expresión de *C-MYC* durante la salida de quiescencia.

Quiescence or G0 is a resting state reached by cells under growth inhibitory conditions. Both, the entrance in G0 and the exit from it are tightly controlled processes. We have investigated the mechanisms that regulate the expression of *Ccng2* (cyclin G2) and *C-MYC*, two genes involved in such events. While cyclin G2 is necessary to maintain the quiescent state, C-MYC is crucial for progression to and through the G1 phase. Our results show elevated cyclin G2 expression levels in quiescent cells and a PI3K-dependent reduction of its expression as cells exit from quiescence. FoxO3a, a transcription factor negatively regulated by PI3K, binds to and transactivates the *Ccng2* gene promoter. Inhibition of FoxO-mediated transcription through overexpression of an inactive form of these factors decreases *Ccng2* expression. These results show that FoxO factors regulate *Ccng2* expression. Regarding *C-MYC*, although its promoter has an E2F binding-site, this gene is able to escape the repressive effect of E2F/RB complexes during the exit from G0. We have uncovered a nuclear factor (EMYCS) that binds to a site overlapping the E2F element of this promoter and that has an estimated molecular weight of 105 kDa. This protein does not correspond to any E2F or other transcription factors known to interact with the E2F element from the *C-MYC* promoter. EMYCS has transcriptional transactivation capacity and our results suggest that it is required to activate *C-MYC* expression during exit from quiescence.

Índice

CLAVE DE ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	5
1. El ciclo celular	7
1.1. Quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)	7
1.2. Ciclinas	8
1.3. Regulación de los complejos ciclina/CDK	8
1.4. La familia RB: sustratos de las CDKs	9
1.5. La fase G0	11
1.6. Control de la salida de quiescencia y progresión a través del ciclo celular	12
2. La ruta de PI3K	13
2.1. Características	13
2.2. Regulación de la actividad PI3K	13
2.3. Señalización de PI3K	14
2.4. La familia FoxO	15
3. Ciclina G2	16
3.1. Características	17
3.2. Posibles mecanismos de acción	17
3.3. Regulación de la expresión	18
4. C-MYC	19
4.1. Características	19
4.2. Funciones	20
4.3. Regulación de la expresión	20
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Células	31
1.1. Cultivo celular	31
1.2. Transfecciones	31
1.3. Sincronización celular	32
1.4. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	32
2. Plásmidos y construcción de vectores	33
2.1. Estudios sobre ciclina G2	33
2.2. Estudios sobre C-MYC	33

3. Ensayos bioquímicos	34
3.1. Preparación de extractos nucleares	34
3.2. Análisis de cambio de movilidad electroforética (EMSA)	35
3.3. Entrecruzado por luz ultravioleta (UV crosslinking)	37
3.4. Ensayos de interferencia por metilación	37
3.5. Lisis celular, SDS-PAGE e inmunoblot	38
3.6. Ensayos de actividad luciferasa Firefly y Renilla y de β -galactosidasa	38
3.7. Northern Blot	39
3.8. RT-PCR en tiempo real o cuantitativa	40
3.9. Inmunoprecipitación de cromatina	41
4. Inmunofluorescencias	42
5. Anticuerpos y reactivos	43

RESULTADOS 45

I. CICLINA G2 47

1. Cambios en la expresión de ciclina G2 a lo largo del ciclo celular	47
1.1. Diferenciación de las fases G0 y G1 del ciclo celular	47
1.2. Los niveles de expresión del ARNm de ciclina G2 varían a lo largo del ciclo celular en fibroblastos NIH3T3	48
2. Estudio de las vías de señalización que regulan la expresión de ciclina G2	50
2.1. PDGF e IGF, pero no LPA o PA, inducen la disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2.	50
2.2. La vía de señalización de PI3K induce disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2	51
3. Implicación de los factores FoxO en la regulación de la expresión de ciclina G2	52
3.1. FoxO3a activa la expresión del ARNm de ciclina G2	52
3.2. FoxO3a se une al promotor de ciclina G2	54
3.3. El promotor de ciclina G2 es transactivado por FoxO3a	57

II. C-MYC 58

1. Descubrimiento de un nuevo factor que se une al promotor del gen <i>C-MYC</i>	58
1.1. El elemento E2F del promotor de <i>C-MYC</i> une un factor que no interacciona con el elemento E2F de otros promotores	58
2. Caracterización de EMYCS	60
2.1. EMYCS no es reconocido por anticuerpos contra las familias de RB y E2F	60
2.2. Estimación del peso molecular relativo de los componentes del complejo EMYCS	63
2.3. El factor EMYCS y los factores E2F se unen al sitio E2F del promotor	

de C-MYC a través de distintas secuencias nucleotídicas	64
2.4. El factor EMYCS se expresa de forma ubicua y presenta actividad de unión a ADN constitutiva	66
3. Función del complejo EMYCS en la regulación del promotor <i>C-MYC</i>	67
3.1. EMYCS actúa como activador transcripcional	67
3.2. EMYCS actúa como activador transcripcional de <i>C-MYC</i> en linfocitos T durante la salida de quiescencia	69
4. Determinación de la identidad de los factores que componen el complejo EMYCS	71
4.1. EMYCS no se corresponde con los factores ETS	71
4.2. EMYCS no es un miembro de la familia STAT de factores de transcripción	72
4.3. EMYCS no pertenece a la familia NFAT	73
4.4. Otras aproximaciones	74
DISCUSIÓN	75
I. CICLINA G2	77
1. Cambios en la expresión de ciclina G2 a lo largo del ciclo celular	77
2. Estudio de las vías de señalización que regulan la expresión de ciclina G2	79
3. Implicación e los factores FoxO en la regulación de la expresión de ciclina G2	80
4. Posibles mecanismos de regulación de la proliferación celular mediada por ciclina G2	82
II. C-MYC	84
1. Determinación de la identidad de EMYCS	85
2. Mecanismos de la expresión de <i>C-MYC</i> durante la salida de quiescencia	86
3. Modelo de activación de <i>C-MYC</i> en la transición G/G1	88
CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXO	115

Clave de abreviaturas

BrdU: bromodeoxiuridina
CAK: quinasa activadora de CDKs
CDK: quinasa dependiente de ciclina
CKI: inhibidor de CDKs
DMS: dimetilsulfato
EMSA: Ensayos de cambio de movilidad electroforética
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares
ETS: E26
FCS: suero de ternera fetal
FKH: Forkhead (factores de transcripción)
FoxO: factores Forkhead o Fox de clase O
HDAC: histona deacetilasa
HMT: histona metiltransferasa
IGF: factor de crecimiento similar a insulina
JNK: quinasa c-jun NH2 terminal
KLF11: factor similar a Krüppel 11
LPA: ácido lisofosfatídico
MAZ: proteína con dedos de zinc asociada a *MYC*
MEK: MAP quinasa o ERK quinasa
METS: supresor transcripcional de ETS mitogénico
mTOR: diana de mamífero para rapamicina
NFATc1: Factor nuclear c1 de células T activadas
PA: ácido fosfatídico
PBS: tampón fosfato salino
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK1: proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1
PI3K: fosfoinosítido 3 quinasa
PKB: proteína quinasa B
Plk: quinasa similar a Polo
PP2A: proteína fosfatasa 2A
RB: Retinoblastoma
SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico 10%
p70S6K: proteína quinasa de S6
STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción
SWI/SNF: Interruptor/sacarosa no fermentable
TGFβ: factor de crecimiento transformante beta

Introducción

1. EL CICLO CELULAR

La división celular es el proceso por el que una célula duplica su contenido en ADN y su masa para producir 2 células (*Tyson y Novak, 2008*). Este proceso es esencial durante el desarrollo para la generación de órganos y tejidos y en el adulto para la reparación y recambio tisular. La división celular es un proceso altamente controlado y defectos en su regulación dan lugar a graves patologías, tales como el cáncer y las enfermedades autoinmunes.

El ciclo celular se divide en 4 fases (**Fig. 11**). En dos de ellas se ejecutan los procesos básicos de la división celular: replicación única y fiel del ADN (fase de síntesis o **fase S**) y el reparto de los componentes celulares en dos células hijas (mitosis o **fase M**). Ambas fases van precedidas por las fases o intervalos de preparación G1 y G2 (*gap1* y *gap2*) respectivamente (*Malumbres y Barbacid, 2001*). Durante **G1**, la célula crece en tamaño y masa y sintetiza todas las proteínas implicadas en la replicación del ADN. De manera similar, **G2** es una fase de preparación para la mitosis en la que se sintetizan los componentes necesarios tanto para llevar a cabo la segregación del material genético (mitosis) como la del citoplasma (citocinesis). En algunas ocasiones las células dejan de proliferar, ya sea debido a la presencia de señales antimitogénicas o a la ausencia de los estímulos mitogénicos adecuados. En estos casos, las células entran en un estado de quiescencia conocido como **G0** en el que no se dividen y mantienen niveles metabólicos bajos (**Fig. 11**). La célula permanecerá en este estado hasta ser estimulada por factores de crecimiento (*Malumbres y Barbacid, 2001*).

1.1. QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (CDKs)

La progresión a través del ciclo celular está mediada por la activación de una familia de Ser/Thr-quinasas altamente conservadas y de expresión constitutiva, denominadas *quinasas dependientes de ciclinas* (CDKs). En mamíferos se han identificado 20 CDKs, de las cuales 10 (CDKs 1-9 y 11) precisan una subunidad reguladora (ciclinas) para su actividad biológica. De ellas, solo 5 controlan la maquinaria básica del ciclo celular: CDK3 unida a la ciclina C controla la salida de quiescencia, CDK4 y CDK6 en complejo con las ciclinas tipo D (D1, D2 y D3) regulan los eventos tempranos de G1. CDK2 es secuencialmente activada por ciclinas tipo E (E1, E2), durante la transición G1/S y ciclina A2 (ciclina A1 en líneas germinales) durante la progresión de la fase S. Por último, el complejo CDK1/ciclina A2 regula la transición G2/M, mientras que CDK1/ciclina B1 es necesario para la progresión a través de la fase M del ciclo celular (**Fig. 11**) (*Malumbres y Barbacid, 2005; Sanchez y Dynlacht, 2005*).

1.2. CICLINAS

Las ciclinas son moléculas que interaccionan con las CDKs y las activan. Estas proteínas están definidas colectivamente por la presencia de un motivo altamente conservado de aproximadamente 110 aminoácidos conocido como *caja ciclina*, el cual es esencial para su asociación con las Cdk (Nugent et al., 1991; Noble et al., 1997). En la actualidad se han identificado en mamíferos al menos 29 proteínas que presentan dicho motivo (Malumbres y Barbacid, 2005), clasificadas en grupos según similitud estructural, período funcional en el ciclo celular y regulación de su expresión (Pines, 1995; Hunt, 1991; Sherr, 1995). La caja ciclina está flanqueada por una región amino y una carboxilo en las que muchas pero no todas las ciclinas presentan motivos que regulan la estabilidad de la proteína, tales como las *cajas de destrucción* o las *secuencias PEST* (Horne et al., 1996). Las primeras son motivos que favorecen la degradación vía ubiquitinación y posterior proteólisis, mientras que las segundas son secuencias ricas en los aminoácidos prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST) que actúan como desestabilizadoras de proteínas.

1.3. REGULACIÓN DE LOS COMPLEJOS CICLINA/CDK

La actividad de los complejos ciclina/CDK a lo largo del ciclo celular está regulada por una variedad de mecanismos:

a) Disponibilidad de las ciclinas

La disponibilidad de las ciclinas es controlada a través de su síntesis, localización celular y degradación. La síntesis es regulada minuciosamente por factores de transcripción que controlan la expresión de las ciclinas en cada fase del ciclo celular (Tyson y Novak, 2008). La actividad CDK es fundamentalmente nuclear (Tassan et al., 1994); la fosforilación de algunas ciclinas puede actuar como señal de exportación nuclear (Diehl et al., 1997) o, por el contrario, inducir su migración al núcleo (Yang J. et al., 2001; Obaya y Sedivy, 2002). La degradación de la mayor parte de las ciclinas está mediada por la vía de ubiquitina-proteasoma (Peters, 1998).

b) Fosforilación de las CDKs

Para su completa activación, además de la unión con las respectivas ciclinas, las CDKs deben ser fosforiladas en un residuo Thr conservado. Esta fosforilación es llevada a cabo por la quinasa CAK (*CDK activating kinase*), que está compuesta por ciclina H/CDK7 y la proteína Mat1 (Lolli y Johnson, 2005). La actividad de todas las CDKs es también regulada negativamente por fosforilación de un residuo Tyr en el extremo amino terminal. Por otra parte, la reversión de la fosforilación inhibitoria de las CDKs es mediada por las fosfatasas de la familia CDC25 (CDC25A, CDC25B Y CDC25C) (Obaya y Sedivy, 2002).

c) Inhibidores de las CDKs (CKIs)

Los CKIs son proteínas de bajo peso molecular que inhiben la actividad de los complejos CDK/ciclina mediante interacción directa (Sherr y Roberts, 1999). Existen 2 familias de CKIs. La familia INK4 (*Inhibitors of CDK4*) incluye p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D}, quienes se unen a las quinasas CDK4 y CDK6 impidiendo su interacción con ciclina D. La familia Cip/Kip (*CDK inhibitor proteins/kinase inhibitor proteins*) comprende a p27^{Kip1}, p57^{Kip2} y p21^{Cip1}, los cuales forman complejos inactivos con CDK2/ciclina y CDK1/ciclina (Malumbres y Barbacid, 2001). p27^{Kip1} y p21^{Cip1} también unen CDK/ciclina D formando con ellos complejos activos cuya función es secuestrar a dichos inhibidores, permitiendo así la activación de los complejos CDK2 (Sherr y Roberts, 1999).

1.4. LA FAMILIA RB: SUSTRATOS DE LAS CDKs

Uno de los sustratos principales de las CDKs a través de la fase G1 del ciclo celular son las proteínas de la familia de Retinoblastoma (pRB, p107 y p130) (Sun et al., 2007). Los miembros de esta familia actúan durante las fases G0 y G1 temprana del ciclo celular como represores de varios factores de transcripción, incluyendo miembros de la familia E2F, cuya actividad es necesaria para la progresión a través de distintas fases del ciclo celular (Cam y Dynlacht, 2003). En células quiescentes y en fase G1 temprana, p130 es el miembro de la familia que más se expresa (Smith E. J. et al., 1996), disminuyendo su expresión a medida que las células progresan a través de la fase G1. La proteína Retinoblastoma (pRB), por el contrario, se expresa de manera prácticamente constante y con niveles moderados a lo largo del ciclo celular (Buchkovich et al., 1989). Por su parte, p107 se expresa a bajos niveles en células quiescentes y normalmente no regula la transición G0/G1, pero tiene la capacidad de compensar la pérdida de pRB en células quiescentes (Sage et al., 2003).

Los miembros de la familia RB ejercen su actividad represora a través de 2 mecanismos. Por un lado bloquean el dominio de transactivación de los factores E2F unidos al promotor de sus genes diana (Hiebert et al., 1992; Zamanian y La Thangue, 1993) y, por otra parte, los complejos familia RB/E2F ejercen un efecto dominante negativo sobre la activación de los promotores mediante el reclutamiento de enzimas modificadoras de la cromatina, tales como histona-desacetilasas (HDAC) e histona-metiltransferasas (HMT), y de los complejos SWI/SNF modificadores de la estructura y del posicionamiento de los nucleosomas (Blais y Dynlacht, 2007). Estas proteínas inducen la condensación de la cromatina, impidiendo así la transcripción.

Los miembros de la familia E2F pueden dividirse en 2 grupos: los activadores transcripcionales (E2F1, 2 y 3a) y los represores transcripcionales (E2F3b, 4, 5, 6, 7 y 8) (Cam y Dynlacht, 2003; Blais y Dynlacht, 2004; Frolov y Dyson, 2004; Dimova y Dyson, 2005; de Bruin et al., 2003; Maiti et al., 2005). Los miembros E2F1-6 se unen a sus genes diana en forma de heterodímeros con proteínas de la familia DP (Frolov y Dyson, 2004). Los activadores transcripcionales se expresan principalmente en las fases

G1 y S del ciclo celular y se asocian a pRB. Los represores E2F4 y E2F5 se expresan a lo largo de todo el ciclo celular y se asocian preferentemente a p130 y p107 en G0 y G1 temprana (Cam y Dynlacht, 2003; Cobrinik, 2005; Dimova y Dyson, 2005). E2F3b se asocia en G0 con pRB en lugar de p130 (Leone et al., 2000). E2F7 y E2F8 no forman heterodímeros con DP y, al igual que E2F6, reprimen sus genes diana a través de mecanismos independientes de RB (Dimova y Dyson, 2005).

Las propiedades inhibitorias de la proliferación celular ejercidas por la familia RB son reguladas por fosforilación (Johnson y Schneider-Broussard, 1998). Estas proteínas se encuentran hipofosforiladas en células quiescentes, lo que permite su unión a los factores de transcripción E2F y la represión de sus genes diana. Cuando las células entran en la fase G1 desde quiescencia, los miembros de la familia RB son fosforilados secuencialmente por ciclina C/CDK3 (Ren y Rollins, 2004) ciclina D/CDK4/6 (Kato et al., 1993) y ciclina E/CDK2 (Lundberg y Weinberg, 1998) (Fig. 11), liberando así los factores E2F activadores en el núcleo y permitiendo la exportación de E2F4 y E2F5 al citoplasma (Lindeman et al., 1997). Esto permite la transcripción de genes necesarios para la progresión de G1 y la replicación del ADN (Malumbres y Barbacid, 2001; Obya y Sedivy, 2002).

Por otro lado, la actividad de pRB también se puede regular por acetilación mediada por acetilasas de histonas asociadas a p300/CBP. Estas acetilasas previenen la fosforilación de pRB por ciclina E/CDK (Malumbres y Barbacid, 2001).

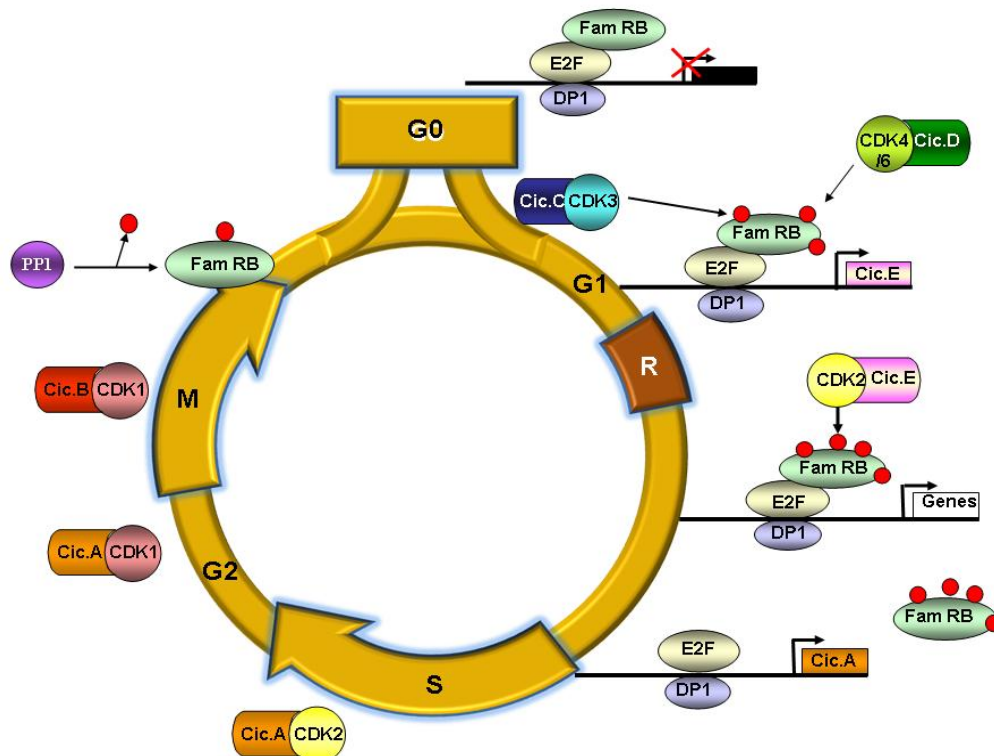


Figura 11. Representación esquemática del ciclo celular. En la figura se representan las fases del ciclo celular, así como los complejos ciclina/CDK que participan en cada fase. Además se muestran las modificaciones experimentadas por los miembros de la familia RB y su interacción con los dímeros E2F/DP1 unidos a los promotores de los genes diana. Fam RB: familia RB; Cic: Ciclina; R: punto de restricción.

1.5. LA FASE G0

Bajo ciertas condiciones, incluyendo alta densidad celular o ausencia de factores de crecimiento, las células se acumulan en un estado con un contenido $2n$ de ADN y con una actividad metabólica reducida. Algunos investigadores consideran que este estado no se corresponde con una detención de las células en la fase G1, sino con su entrada en quiescencia o fase G0 (*Smith J. A. y Martin, 1973; Martin y Stein, 1976*). Si bien los mecanismos exactos que controlan la decisión de las células de entrar en la fase G0 no se conocen, las células quiescentes se distinguen de las que proliferan por tener una tasa de síntesis de proteínas reducida (*Alvarez et al., 2003*), por inducir la expresión de determinados genes necesarios para el mantenimiento de la quiescencia, entre los que se encuentran el inhibidor de CDKs p27^{Kip1} (*Polyak et al., 1994*) y la proteína p130 (*Smith E. J. et al., 1996*) y por necesitar más tiempo para completar la fase G1 (*Collier, 2007*), que quizás refleja el tiempo necesario para la síntesis de proteínas requeridas para la progresión por G1 y S. En relación con esto último, se ha descrito que en células quiescentes algunas proteínas necesarias para iniciar la replicación del ADN, entre ellas CDC6, son expresadas en menor medida. Además, CDC6 no se encuentra unida a la cromatina. Por el contrario, en las células que proliferan los niveles de CDC6 se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular y esta proteína se encuentra constitutivamente unida a los orígenes de replicación del ADN (*Collier, 2007*).

Como hemos comentado, la expresión de p27^{Kip1} y p130 es elevada en G0 y se encuentra regulada positivamente por la familia de factores de transcripción FoxO (*Medema et al., 2000; Kops et al., 2002*). Como veremos más adelante con más detalle, dichos factores están activos en G0 pero son inactivados al salir las células del estado quiescente. A medida que las células progresan hacia la fase G1 y los factores FoxO son inactivados, los niveles de p27^{Kip1} y p130 disminuyen favoreciendo la progresión del ciclo celular (*MacLachlan et al., 1995; Smith E. J. et al., 1996*). Además, en el caso de p27^{Kip1}, este factor es secuestrado por los complejos ciclina D/CDK4/6 impidiendo así su efecto inhibidor sobre la actividad de CDK2 (*Sherr, 1994*).

Una vez que las células entran en quiescencia, algunas de ellas mueren debido a que los factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular también lo son para su supervivencia, otras sufren procesos de diferenciación o de senescencia y otras permanecen en ese estado hasta que los factores de crecimiento y los nutrientes vuelven a estar disponibles (*Sherr, 1994*), momento en que las células comienzan nuevamente a proliferar.

1.6. CONTROL DE LA SALIDA DE QUIESCENCIA Y PROGRESIÓN A TRAVÉS DEL CICLO CELULAR

Durante G1 se puede distinguir una fase inicial dependiente de mitógeno y una segunda fase en la que el ciclo progresará aunque los nutrientes hayan sido eliminados del medio extracelular. El punto a partir del cual la célula puede proliferar en ausencia de estímulos mitogénicos se conoce como punto de restricción (R, véase Fig. I1) (Pardee, 1974) y permite dividir la fase G1 en temprana o tardía. R es un punto de no retorno: una vez alcanzado, la célula debe completar una ronda de división celular. Una célula solo puede entrar en la fase G0 desde G1 si aún no ha sobrepasado R (Collier, 2007).

La estimulación de células en fase G0 por factores de crecimiento induce la activación de una serie de vías de señalización que estimulan, por un lado, el crecimiento celular a través de la vía de PI3K/mTOR/p70S6K (Thomas, 2002) y por otro, la progresión del ciclo celular. Durante la transición G0/G1 se produce el ensamblaje de los complejos ciclina C/CDK3 (Fig. I1) que parecen ser los primeros en fosforilar a pRB (Ren y Rollins, 2004). Además, en este punto se induce rápidamente la expresión de *C-MYC* (Kelly et al., 1983) que, a su vez, induce la expresión de ciclina D (Bouchard et al., 2004), permitiendo la activación de CDK4/6 en la fase G1 temprana. Esta activación permite la fosforilación parcial de los miembros de la familia RB (Kato et al., 1993) y la consiguiente estimulación parcial de los complejos E2F activadores, que inician la transcripción de una serie de genes regulables por E2F, entre los que se encuentra el de la ciclina E (Fig. I1) (Geng et al., 1996). Ciclina E se une a CDK2 y este complejo hiperfosforila los miembros de RB causando la separación de pRB de su unión a los E2F activadores y de p130/p107 de su unión a los E2F represores. Los factores E2F totalmente activos inician entonces, en la transición G1/S, la transcripción de ciclina A y de proteínas necesarias para la replicación (Fig. I1) (Henglein et al., 1994). Por ello, gran parte de los genes con elemento promotor E2F conocido son activados en (o cerca de) la transición G1/S. Una vez en la fase S, se produce la degradación de ciclina E por la vía del proteosoma (Strohmaier et al., 2001) y CDK2 se une entonces a ciclina A (Fig. I1). Los complejos activos ciclina A/CDK2 están directamente implicados en la progresión y salida de la fase S (Dymlacht et al., 1994; Krek et al., 1994). Posteriormente, la ciclina A forma complejo con CDK1, lo que es necesario para la transición G2/M (Fig. I1). En la fase G2 se induce la expresión de las ciclinas de tipo B, las cuales forman complejos con CDK1 (Fig. I1), mientras que las ciclinas tipo A son degradadas por proteólisis al comienzo de la mitosis (Malumbres y Barbacid, 2005, 2009). Los complejos ciclina B/CDK1 regulan la progresión a través de M mediante fosforilación de sustratos que permitirán la ruptura de la envoltura nuclear, la separación de los centrosomas, la reorganización de los microtúbulos en el huso mitótico, la condensación de la cromatina para formar los cromosomas y la fragmentación del aparato de Golgi (Nigg, 2001). Hacia el final de la anafase, la inactivación de ciclina B/CDK1 mediante la degradación de la ciclina B por proteólisis permite la correcta salida de M (Vorlauffer y Peters, 1998). Además, la defosforilación de los miembros RB en este

punto, recupera la capacidad represora de la proliferación de estas proteínas, necesaria para comenzar un nuevo ciclo (Fig. I1) (Tamrakar et al., 2000).

2. LA RUTA DE PI3K

La enzima fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K) constituye una de las múltiples familias de quinasas activadas en respuesta a la unión de factores de crecimiento a sus receptores de membrana y es una de las más importantes ya que controla funciones clave para las células tales como supervivencia, metabolismo, reorganización del citoesqueleto y migración celular, división celular y crecimiento celular. Además PI3K regula la activación de la respuesta inmune (Katso et al., 2001; Krasilnikov, 2000).

2.1. CARÁCTERÍSTICAS

Las enzimas PI3K fosforilan la posición 3'-OH del anillo inositol del fosfatidil-inositol (PI) y los fosfoinosítidos derivados presentes en la membrana celular, para generar fosfatidil-inositol-3-fosfato [PI(3)P], fosfatidil-inositol-3,4-bifosfato [PI(3,4)P2 o PIP2] y fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato [PI(3,4,5)P3 o PIP3]. Los niveles de PIP3 y PIP2 son muy bajos en células quiescentes y aumentan de manera significativa y transitoria en respuesta a estímulos mitogénicos, por lo que se comportan como segundos mensajeros (Stephens et al., 1993). La familia PI3K está dividida en tres clases (Zvelebil et al., 1996). Cada miembro está compuesto por una subunidad catalítica y una reguladora. La PI3K de clase IA es un heterodímero compuesto de una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora p85 (Hiles et al., 1992; Escobedo et al., 1991). La subunidad p85 estimula la actividad quinasa de p110 (Klippel et al., 1993; Klippel et al., 1994). A lo largo de esta tesis nos referiremos a PI3K de clase IA como PI3K.

2.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PI3K

La unión de un factor de crecimiento a su receptor induce la actividad Tyr-quinasa intrínseca del receptor o de quinasas asociadas, que fosforilarán residuos de Tyr en el propio receptor o en moléculas adaptadoras (Fig. I2). Entre los receptores con actividad Tyr quinasa intrínseca encontramos al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor del factor de crecimiento similar a insulina (IGF). p85 se une a los residuos de fosfo-Tyr, reclutando así p110 a la membrana, donde se encuentran sus sustratos, e induciéndole un cambio conformacional que provoca la activación del enzima (Fig. I2) (Panayotou et al., 1992). El reclutamiento de p110 a la membrana por p85 es esencial para su activación, de hecho, la adición de un sitio de farnesilación a p110 α recombinante (p110-CAAX) resulta en una activación

constitutiva del enzima por anclaje permanente a la membrana (Jimenez *et al.*, 1998). Asimismo, PI3K también puede ser activada por Ras (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994). La señal intracelular iniciada por PI3K puede ser a su vez inactivada por el supresor de tumores PTEN (*phosphatase and tensin homolog detected on chromosome 10*) (Fig. I2) (Stambolic *et al.*, 1998).

2.3. SEÑALIZACIÓN DE PI3K

PIP3 y PIP2 generados en la membrana por acción de PI3K reclutan proteínas con dominios de unión de lípidos, las cuales mediarán la propagación de la señal de PI3K (Haslam *et al.*, 1993). Entre estas moléculas señalizadoras encontramos las Ser/Thr-quinasas proteína quinasa B (PKB) y proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1 (PDK1, *3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*).

Las proteínas de la familia **PKB** son Ser/Thr quinasas que fosforilan una serie de sustratos celulares implicados en múltiples funciones. La activación de PKB requiere en primer lugar su unión a los PIP3 generados por PI3K, lo que implica su translocación a la membrana (Fig. I2) (Klippel *et al.*, 1997; Frech *et al.*, 1997). Para su completa activación, PKB ha de ser fosforilada secuencialmente en dos residuos: Thr308 y Ser473. El primero es fosforilado por la quinasa PDK1, mientras que el segundo es fosforilado por otra quinasa diferente (Fig. I2) (Lawlor y Alessi, 2001; Surucu *et al.*, 2008). **PDK1** está constitutivamente localizada en la membrana celular y es activada directamente por PIP2 y PIP3 sin necesidad de fosforilación (Fig. I2) (Mora *et al.*, 2004).

La fosforilación mediada por la vía de señalización PI3K/PDK1/PKB regula una gran variedad de respuestas celulares a través de la modulación de la actividad, localización y/o degradación de proteínas implicadas directa o indirectamente en dichas respuestas. Una de las dianas de esta vía son algunos miembros de la familia Forkhead (FKH) de factores de transcripción. Esta familia comprende un grupo de factores de transcripción que se unen como monómeros a sus correspondientes secuencias consenso en el ADN (Furuyama *et al.*, 2000) y actúan tanto induciendo como reprimiendo la transcripción de determinados genes.

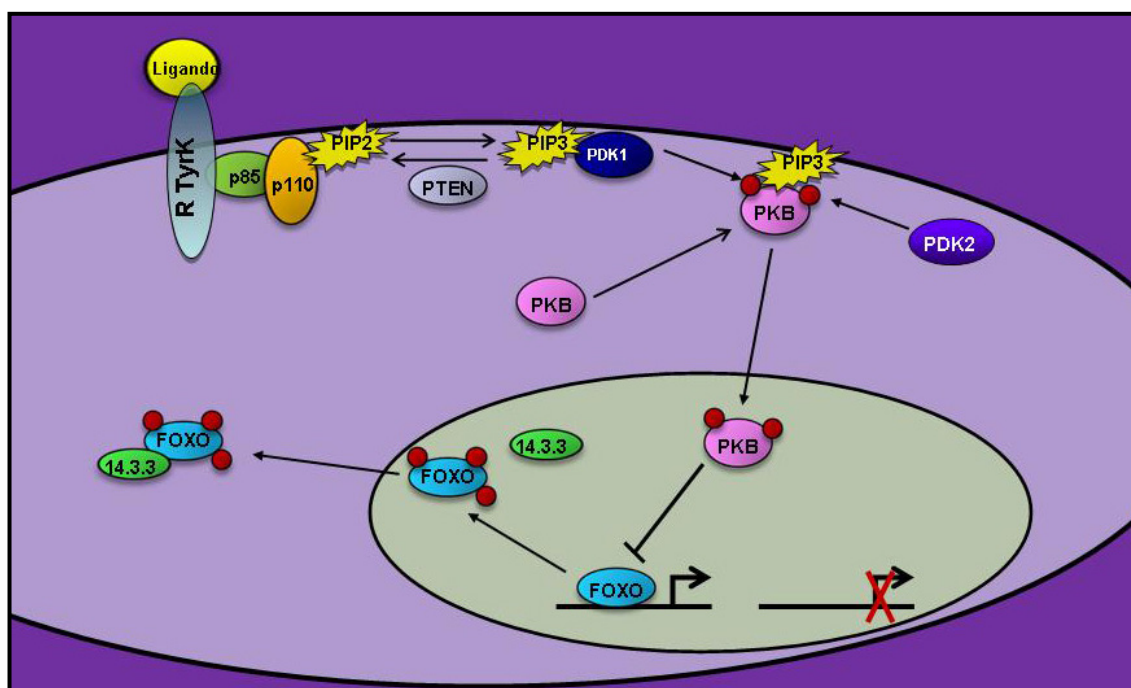


Figura I2. Esquema de la activación de la vía de señalización de PI3K y regulación de la actividad de los factores FoxO. La unión de un ligando a su receptor Tyr-quinasa induce la activación de PI3K y la generación de PIP3. Esto permite la activación de PDK1 y PKB. PKB a su vez fosforila e inactiva a los factores FoxO, los cuales se unen a la proteína 14-3-3 y son exportados al citoplasma. Adaptada de Arden y Biggs, 2002 (*Arden y Biggs, 2002*).

2.4. LA FAMILIA FOXO

La familia FKH o Fox (*Forkhead box*) está dividida en subfamilias según similitud estructural y/o funcional. La subfamilia de clase O, FoxO, comprende 4 proteínas funcionalmente relacionadas: FoxO1, FoxO3a, FoxO4 y FoxO6 (*Galili et al., 1993; Shapiro et al., 1993; Hosaka et al., 2004; Borkhardt et al., 1997; Jacobs et al., 2003*). Estos factores se unen al ADN a través de un motivo consenso que tiene un núcleo TTGTTTAC (*Furuyama et al., 2000*). No obstante, las proteínas FoxO también pueden regular la transcripción por unión a secuencias no consenso en los promotores diana (*Ramaswamy et al., 2002*). Además, los factores FoxO cooperan con otros factores de transcripción y coactivadores en la regulación de la expresión de algunos promotores (*Seoane et al., 2004; Nasrin et al., 2000*).

Los factores FoxO regulan una gran variedad de genes relacionados con apoptosis, metabolismo, ciclo celular, diferenciación, envejecimiento y respuesta al estrés (*Greer y Brunet, 2005*). Respecto de la regulación de la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, los factores FoxO inducen la expresión del inhibidor de CDKs p27^{kip1} (*Medema et al., 2000*), la proteína p130 de la familia RB (*Kops et al., 2002*) y proteínas que regulan la transición G2/M del ciclo celular tales como ciclina B y Plk (*Alvarez et al., 2001; Yuan et al., 2008*). Además, actúan como represores de la transcripción de las ciclinas D1 y D2, aunque en este caso no parece que sea por unión directa a los

promotores (*Schmidt et al., 2002; Bouchard et al., 2004*). Todo esto indica que los factores de transcripción FoxO están implicados tanto en el mantenimiento de la quiescencia (G0) como en la transición G2/M.

La actividad de los factores FoxO está altamente regulada *in vivo*. En respuesta a la estimulación por factores de crecimiento o al estrés oxidativo, las proteínas FoxO son modificadas por fosforilación, acetilación y ubiquitinación. Colectivamente, estas modificaciones regulan su localización celular, su actividad transcripcional y su estabilidad (*Brunet et al., 1999; Motta et al., 2004; van der Horst et al., 2006*). Los factores FoxO son importantes blancos fisiológicos de la vía de señalización de PI3K (**Fig. I2**). En concreto, PKB inactiva por fosforilación estos factores de transcripción (*Brunet et al., 1999; Kops y Burgering, 2000*). Cuando PKB está inactiva, los miembros de la familia FoxO se encuentran defosforilados y se localizan en el núcleo, donde regulan la transcripción de sus genes diana. La estimulación de la vía de señalización de PI3K por factores de crecimiento activa PKB, que fosforila los factores FoxO. Una vez fosforilado, FoxO se unirá a la proteína 14-3-3, lo que provoca su liberación del ADN y translocación al citoplasma (**Fig. I2**). Esto resulta en la inhibición de la transcripción mediada por estos factores (*Biggs et al., 1999; Guo et al., 1999; Kops et al., 1999; Brunet et al., 1999; Arden y Biggs, 2002*). La fosforilación por PKB además modula la estabilidad de los factores FoxO induciendo su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (*Plas y Thompson, 2003; Aoki et al., 2004; Huang et al., 2005*).

Otras quinasas pueden fosforilar también las proteínas FoxO, algunas de forma independiente de la vía de PI3K (*Burgering y Kops, 2002; Tran et al., 2003; Brunet et al., 2001; Huang y Tindall, 2007*) y contribuir a la degradación de dicho factor de transcripción.

3. CICLINA G2

Como se ha descrito previamente, las ciclinas son proteínas que actúan normalmente como subunidades reguladoras de las CDKs. Sin embargo, algunas de ellas carecen de CDK u otra quinasa conocida asociada. Tal es el caso de las ciclinas del grupo G. Este grupo comprende 3 miembros: ciclina G1 (*Tamura et al., 1993*), ciclina G2 (*Horne et al., 1996*) y ciclina I (*Nakamura et al., 1995*). Las ciclinas del grupo G, a diferencia de las ciclinas clásicas, se expresan en tejidos ricos en células terminalmente diferenciadas (*Tamura et al., 1993; Horne et al., 1996; Horne et al., 1997; Nakamura et al., 1995*). Si bien las ciclinas G1 y G2 comparten una gran similitud estructural, las diferencias en su patrón de expresión en el ciclo celular, en la regulación de su expresión y en su localización celular, sugieren que estas ciclinas desempeñan funciones diferentes no compensatorias (*Horne et al., 1996; 1997*).

3.1. CARACTERÍSTICAS

El análisis del ARNm de ciclina G2 de ratón (2,8 kb) predice una proteína de aproximadamente 40 kDa, que contiene 2 residuos de tirosina potencialmente fosforilables, uno en la caja ciclina, característico de las ciclinas (*Hunter, 1982*) y otro en el extremo carboxilo. Esto podría implicar a ciclina G2 como componente de alguna vía de señalización que regule la proliferación celular (*Horne et al., 1996*). Además, ciclina G2, a diferencia de ciclina G1, contiene secuencias PEST, lo que podría favorecer la degradación cíclica de esta ciclina (*Horne et al., 1996*). De hecho, mientras que la expresión de ciclina G1 es constante a lo largo del ciclo celular, con sólo un pequeño pico de expresión en la fase G1 temprana, la expresión del gen de ciclina G2 (*Ccng2*) oscila a lo largo del ciclo celular (*Horne et al., 1996; 1997*). *Ccng2* se expresa en gran medida en tejidos ricos en células diferenciadas terminalmente como cerebro y cerebelo, o bien en tejidos como el bazo y el timo donde se produce la selección negativa de los linfoblastos auto-reactivos por detención del ciclo celular y apoptosis (delección clonal) (*Horne et al., 1996; 1997*).

La ciclina G2 expresada de manera ectópica se distribuye preferentemente en el citoplasma (*Jensen et al., 1999; Bennin et al., 2002*), aunque también se localiza en el núcleo y la región perinuclear (*Bennin et al., 2002*). Por lo tanto, se especula que esta ciclina puede migrar al núcleo en momentos concretos del ciclo celular o en respuesta a la activación de determinadas vías de señalización (*Bennin et al., 2002*).

3.2. POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, a diferencia de las ciclinas clásicas que promueven la proliferación celular por activación de CDKs, las ciclinas del grupo G no actúan aparentemente asociadas a CDKs y se comportan como inhibidores del ciclo celular en algunos tipos celulares y podrían facilitar el mantenimiento del estado quiescente de células diferenciadas (*Bennin et al., 2002*). Sin embargo, mientras que la ciclina G1 parece que actúa preferentemente como regulador negativo de la transición G2/M en respuesta al daño del ADN (*Jensen et al., 1998; Shimizu et al., 1998; Kimura et al., 2001*), la expresión incrementada de ciclina G2 ha sido correlacionada con detención del ciclo celular en G0/G1 (*Horne et al., 1997; Bennin et al., 2002*). Las ciclinas G1 y G2 tienen una alta identidad de secuencia con ciclina A (*Horne et al., 1996*). A pesar de ello, no se ha detectado actividad quinasa en inmunoprecipitados de ciclina G2 (*Bennin et al., 2002*). Aún así, no se puede descartar que ciclina G2 se asocie a CDK y que su actividad no haya sido detectada, o bien, que la asociación de esta ciclina con una quinasa y la activación de ésta ocurra sólo en respuesta a señales específicas (*Bennin et al., 2002*).

Por otro lado, se ha observado que las ciclinas G1 y G2 pueden asociarse a la fosfatasa PP2A (Okamoto *et al.*, 1996; Bennin *et al.*, 2002), una serina-treonina fosfatasa con localización intracelular ubicua, cuya actividad es esencial para un gran número de funciones celulares incluyendo la transducción de señales, la regulación del citoesqueleto, la regulación de la división celular y la diferenciación (Janssens y Goris, 2001; Millward *et al.*, 1999). Distintas evidencias experimentales sugieren que ciclina G2 podría inhibir la progresión del ciclo celular alterando la especificidad de sustrato de PP2A (Bennin *et al.*, 2002).

3.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN

Si bien varios grupos han estudiado la regulación de ciclina G2, hasta el momento en que se realizó este trabajo no se conocían los mecanismos que controlan la expresión de dicha proteína. El perfil de expresión del gen *Ccng2* es atípico ya que su ARNm es regulado positivamente por estímulos inhibitorios de la proliferación o inductores de apoptosis (Horne *et al.*, 1997). Concretamente, la expresión de *Ccng2* es regulada positivamente en células B maduras por señales inhibitorias del crecimiento como las inducidas por dexametasona y el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) o bien por la estimulación de células B inmaduras con antígeno, que induce detención del ciclo celular y apoptosis, llevando a la delección clonal de estas células (Horne *et al.*, 1997).

Se ha descrito que la expresión de ciclina G1 es regulada positivamente por el supresor de tumores p53, que es activado en respuesta a estímulos genotóxicos (Okamoto y Beach, 1994; Zauberman *et al.*, 1995). Si bien la expresión de *Ccng2* también es inducida por daño del ADN, se ha comprobado que este evento es independiente de la activación por p53 (Bates *et al.*, 1996; Horne *et al.*, 1996). Además, no se han detectado en el promotor de *Ccng2* sitios consenso de unión a p53 (Jensen *et al.*, 1999).

La traducción de ciclina G2 es inducida en células Jurkat tratadas con rapamicina, un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas induciendo detención del ciclo celular en la fase G0/G1 (Grolleau *et al.*, 2002). Por lo tanto, si bien el tratamiento con rapamicina normalmente bloquea la síntesis proteica, al mismo tiempo se ha visto que induce de alguna manera la síntesis de varias moléculas que actúan como reguladores negativos del ciclo celular. Estas proteínas, entre ellas ciclina G2, podrían contribuir junto con rapamicina al bloqueo de la progresión del ciclo celular (Grolleau *et al.*, 2002). Por lo tanto, la vía mTOR/p70S6K podría estar involucrada en la regulación de ciclina G2.

Asimismo, se ha observado que la expresión de *Ccng2* es regulada negativamente en una serie de tumores humanos, como ocurre en tumores de tiroides (Ito *et al.*, 2003) y de la mucosa oral (Kim *et al.*, 2004). En ambos casos, la disminución de la expresión de *Ccng2* se correlaciona de manera directa con el grado de transformación maligna de las células. Estos hallazgos se han confirmado analizando líneas celulares tumorales (Frasor *et al.*, 2003). Por otro lado, la sobreexpresión de ciclina G2 en células

tumorales inhibe de manera significativa la proliferación celular y la formación de colonias, aumentando la población de células en fase G0/G1 del ciclo y disminuyendo la presente en fase S (*Liu et al., 2004; Kim et al., 2004; Tian et al., 2002*).

Todos estos datos refuerzan la idea de que ciclina G2 es un inhibidor del ciclo celular y que la disminución de su expresión puede tener un papel importante en la progresión maligna de varios tipos celulares. Por ello, ciclina G2 podría convertirse en el futuro en una diana para el tratamiento del cáncer.

4. C-MYC

4.1. CARACTERISTICAS

El producto del gen *C-MYC* es un factor de transcripción que actúa como regulador clave del comportamiento celular ya que participa en la regulación del crecimiento, proliferación, metabolismo, diferenciación y apoptosis de las células, dependiendo de las condiciones fisiológicas (*Adhikary y Eilers, 2005; Baena et al., 2005; Dang, 1999; de Alboran et al., 2004; de Alboran et al., 2001; Vaque et al., 2008; Ceballos et al., 2000*). Esto lo hace a través de su habilidad para regular hasta un 10-15% de los genes (*Chung y Levens, 2005*). Además C-MYC gobierna eventos asociados con la progresión tumoral, tales como estabilidad genómica, migración y angiogénesis (*Vervoorts et al., 2006*).

C-MYC es un miembro de la familia de factores de transcripción con dominio b-HLHZ (región básica/hélice-bucle-hélice/cremallera de leucina) a la que pertenecen además MAX y MAD (*Vervoorts et al., 2006*). Se trata de una proteína nuclear que presenta un dominio de transactivación (TAD) en su extremo N-terminal y un dominio de dimerización en el extremo C-terminal, que contiene el motivo HLHZ, y el dominio de unión al ADN (*Dang et al., 2005*).

C-MYC forma heterodímeros con MAX para unirse al ADN y ejercer sus funciones. Estos complejos se unen a sitios específicos del ADN llamados cajas E (*E-box*) (*Luscher y Larsson, 1999*). Mediante su unión a las cajas E, los heterodímeros MAX/C-MYC activan la transcripción de sus genes diana a través de la interacción con diferentes cofactores que se asocian a enzimas que regulan la estructura de la cromatina (*Cole y Nikiforov, 2006*). Pero además, los heterodímeros MAX/C-MYC pueden unirse a sitios distintos de las cajas E, a través de los cuales C-MYC actúa como represor transcripcional (*Lee et al., 1995; Li et al., 1994; Roy et al., 1993*). C-MYC reprime la transcripción a través del elemento iniciador (Inr), que es un motivo de iniciación transcripcional que se encuentra en ciertos promotores (*Li et al., 1994; Smale y Baltimore, 1989*). Además, C-MYC también reprime genes que no contienen motivos Inr (*Yang B. S. et al., 1993*) a través de la interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción (*Mink et al., 1996; Gaubatz et al., 1995*).

MAX puede formar además homodímeros o bien heterodímeros con otros factores de transcripción de la familia b-HLHZ, como son las proteínas de la familia MAD. Dichos heterodímeros antagonizan la función de C-MYC uniéndose a las cajas E y reprimiendo la transcripción mediante el reclutamiento de proteínas modificadoras de la estructura de la cromatina (*Grandori et al., 2000*). *In vivo*, los complejos MAX/C-MYC predominan en células que proliferan mientras que los complejos MAX/MAD o MAX/MNT se encuentran principalmente en células quiescentes (*Ayer y Eisenman, 1993*).

4.2. FUNCIONES

C-MYC actúa como un regulador central del crecimiento celular y la biogénesis de ribosomas (*Iritani y Eisenman, 1999; Adhikary y Eilers, 2005*). Además, también juega un papel central en la progresión del ciclo celular, sobre todo a nivel de la transición G1/S, ya que induce la expresión de miembros de la familia E2F (*Matsumura et al., 2003*), de las ciclinas D2, E y A (*Ponzielli et al., 2005*), de la fosfatasa CDC25 (*Galaktionov et al., 1996*) y de enzimas involucradas en la replicación del ADN (*Dang, 1999*). Por otro lado, C-MYC también reprime la expresión de algunos genes que inhiben proliferación tales como p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p15^{INK4b} y p18^{INK4c}, lo que conduce al aumento de la actividad de los complejos ciclinaD/CDK4 y ciclina E/CDK2 tras la activación de C-MYC y a la consiguiente progresión a través de la fase G1 (*Adhikary y Eilers, 2005*).

4.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN

Dados los efectos que posee C-MYC sobre el destino celular no es de extrañar que las células hayan desarrollado sofisticados mecanismos que aseguren niveles adecuados de expresión de dicha proteína. Una cantidad y/o actividad de C-MYC no adecuada puede resultar en cáncer o en defectos en proliferación o desarrollo. Por ello, la expresión de *C-MYC* es regulada virtualmente por cada una de las vías principales de transducción de señales, tanto proliferativas como antiproliferativas, que impactan a todos los niveles: transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional (*Luscher y Eisenman, 1990; Kelly et al., 1983; Jones y Cole, 1987; Sears et al., 1999; Marcu et al., 1992*). En este trabajo nos centraremos en el estudio de la regulación transcripcional.

El gen *C-MYC* presenta cuatro promotores denominados P0, P1, P2 y P3 (**Fig. I3**) (*Marcu et al., 1992; Potter y Marcu, 1997*). La mayoría de los transcritos se inician en los promotores P1 y P2, con una clara dominancia de P2 (80-90%) en células normales (*Taub et al., 1984; Marcu et al., 1992; Potter y Marcu, 1997*). Este promotor posee una caja TATA y 2 sitios Inr que sinergizan con la caja TATA en la unión de cofactores de transcripción (*Marcu et al., 1997; Facchini et al., 1997*). Además, presenta tres elementos reguladores principales: un sitio ME1a1, un elemento E2F y un sitio ME1a2 (**Fig. I3**). Tanto ME1a1 como ME1a2 funcionan como elementos positivos para la transcripción desde P2 (*Marcu et al.,*

1997). Por otro lado, el sitio E2F se superpone con el sitio de unión para los factores de transcripción ETS-1/2, STAT3, NFATc1, KLF11, METS y SMAD (Fig. I3). ETS-1/2, STAT3, NFATc1 y E2F-1, E2F-2 y E2F-3a libres pueden actuar como activadores transcripcionales de *C-MYC*, mientras que los complejos E2F/familia RB, KLF11, METS y SMAD pueden hacerlo como represores (Wierstra y Alves, 2008). Este sitio de unión combinado parece, como veremos a continuación, que determina el estado general del promotor de *C-MYC*, esto es, si es inducible o no por otras señales (Wierstra y Alves, 2008).

La expresión del ARNm de *C-MYC* es apenas detectada en células quiescentes, pero sus niveles alcanzan un pico de expresión 2-4 h después de la estimulación con factores de crecimiento (Kelly et al., 1983) y disminuyen a un nivel basal constitutivo a lo largo del resto del ciclo celular y en ciclos subsiguientes (Hann et al., 1985; Thompson et al., 1985). Esta expresión constante depende de la presencia permanente de factores de crecimiento: si estos son eliminados o bien las células reciben señales de diferenciación u otras señales antiproliferativas, la expresión de *C-MYC* disminuye (Wierstra y Alves, 2008).

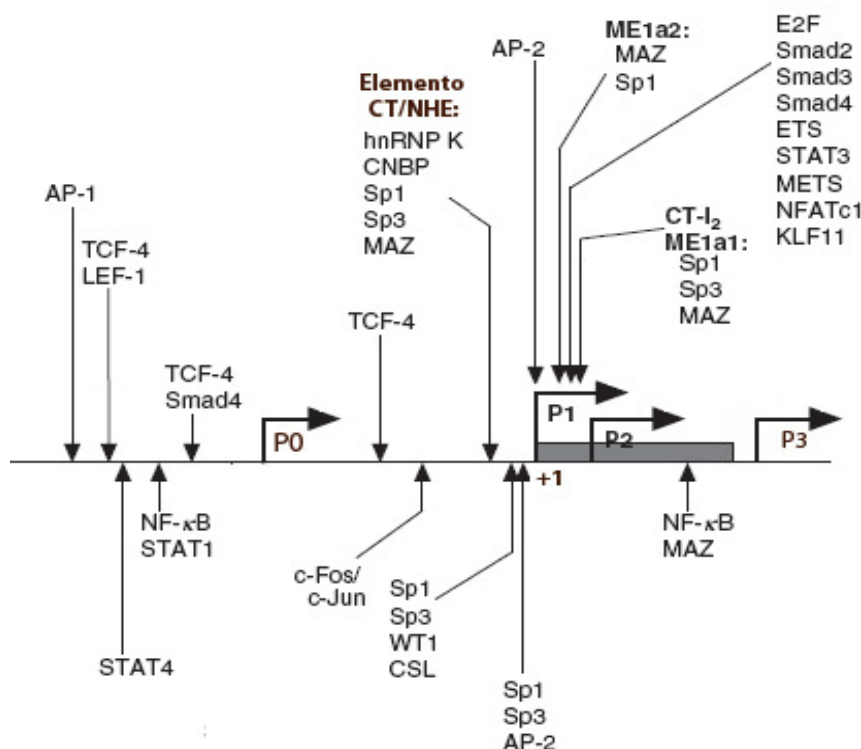


Figura I3. Representación esquemática de la región reguladora del gen *C-MYC*. En la figura se muestra parte de la región reguladora de la expresión del gen y los sitios de unión de los principales factores de transcripción que controlan la expresión de *C-MYC* humano y/o murino. Se indican los elementos principales (en negrita), los sitios de inicio de la transcripción regulados por los promotores P0, P1, P2 y P3 (flechas en negrita) y el exón 1 (en gris). Con fines ilustrativos, los sitios de unión vecinos se representan agrupados en una misma flecha, pero esto no indica necesariamente que sean sitios solapantes. CT-I2 es el homólogo humano del elemento ME1a1 murino. El sitio de inicio de la transcripción desde el promotor P1 se indica como +1. Modificado de Wierstra y Alves, 2008 (Wierstra y Alves, 2008).

La regulación de la transcripción de *C-MYC* se controla a 3 niveles: el estado de compactación de la cromatina, la iniciación de la transcripción y la elongación de la transcripción.

a) Regulación por remodelamiento de la cromatina. Varios factores de transcripción que se unen a la región reguladora de *C-MYC* reclutan enzimas modeladoras de la cromatina, lo que modifica el grado de compactación de ésta y, por lo tanto, la accesibilidad de la maquinaria general de transcripción al promotor. Para el caso del promotor P2 este efecto está mediado, al menos en parte, por la unión de complejos E2F/familia RB/co-represores al elemento E2F (*Albert et al., 2001; Harbour y Dean, 2000*). Dicho elemento tiene una función dual en la regulación de *C-MYC*, ya que determina si el promotor P2 es inducible por otras señales o si es mantenido en un estado no inducible. La regulación de este promotor incluye 3 eventos en los que el elemento E2F y las proteínas de la familia RB juegan un papel fundamental: represión, supresión de la represión y activación. La represión se produce en respuesta a señales antiproliferativas o a la eliminación de factores de crecimiento (células quiescentes) y es mediada por los complejos E2F/familia RB a través del reclutamiento de factores co-represores que inducen la compactación de la cromatina. Por el contrario, la supresión de la represión en respuesta a señales proliferativas (suero y otros mitógenos) que inducen la activación de los complejos ciclina/CDK de G1, consiste en la retirada del ADN de las proteínas de la familia de RB y los co-represores asociados, con la consiguiente apertura de la estructura de la cromatina. A continuación, la activación del promotor podría ser mediada por los factores E2F activadores (E2F-1/2/3) o bien por otros transactivadores cuyas secuencias consenso se hallen superpuestas a la del sitio E2F (*Wierstra y Alves, 2008*).

Otro elemento esencial para la regulación de la expresión del gen *C-MYC* es el denominado elemento CT (también llamado NHE), que se halla situado 100-150 pares de bases por delante del sitio de inicio de la transcripción del promotor P1 (**Fig. I4**) (*Wierstra y Alves, 2008*). Este elemento contiene 5 repeticiones ricas en C y T y, además de la doble hebra, puede formar estructura de hebra sencilla (*Levens et al., 1997; Michelotti G. A. et al., 1996*). Asimismo, la hebra codificadora rica en C y la hebra de anti-sentido rica en G de este elemento pueden formar unas estructuras denominadas i-tetraplex y G-quadruplex, respectivamente, que ejercen un importante papel represor de la expresión de *C-MYC* (**Fig. I4**) (*Simonsson et al., 2000; Siddiqui-Jain et al., 2002; Grand et al., 2004*). Varios factores de transcripción se unen al elemento CT (*Michelotti E. F. et al., 1995; Berberich y Postel, 1995*) permitiendo la ruptura de las estructuras i-tetraplex y G-quadruplex, favoreciendo así la transcripción del gen *C-MYC* (**Fig. I4**) (*Simonsson et al., 2000; Siddiqui-Jain et al., 2002; Grand et al., 2004*).

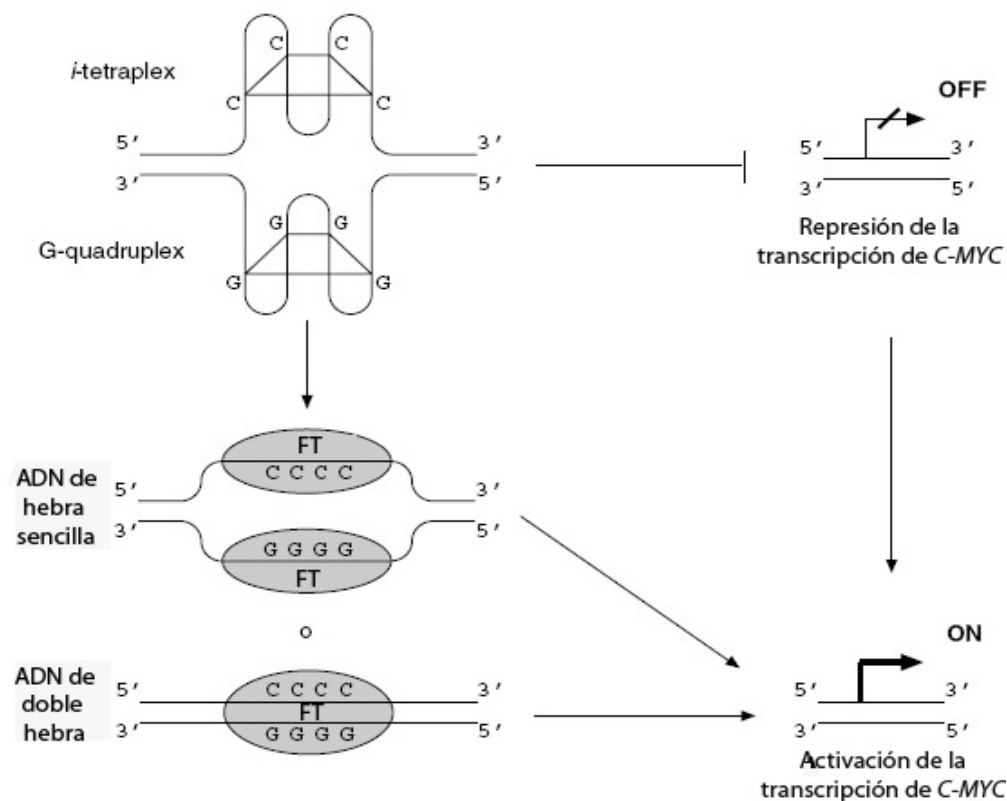


Figura I4. Representación esquemática del elemento CT/NHE. El elemento NHE puede adoptar distintas estructuras. La formación de un G-cuadruplex en la hebra reversa rica en G y de un *i*-tetraplex en la hebra directa rica en C conlleva a la represión de la transcripción de *C-MYC*. La unión de factores de transcripción (FT, indicados con los óvalos grises) ya sea a cada hebra sencilla o a la doble hebra, rompe estas estructuras, permitiendo la transcripción del gen. Modificado de Wierstra y Alves, 2008 (*Wierstra y Alves, 2008*).

b) Regulación de la iniciación de la transcripción. El control de la transcripción de *C-MYC* es muy complejo ya que responde a una multitud de señales biológicas que conforman una red que converge en su promotor y que está sujeta a mecanismos redundantes, bucles de retroalimentación y circuitos regulatorios cruzados (*Wierstra y Alves, 2008*). Además, el efecto de una señal particular sobre la expresión de *C-MYC* depende del contexto celular y del estado fisiológico de la célula. Más aún, en diferentes tipos celulares, la expresión de *C-MYC* puede ser regulada por distintos factores de transcripción generales y/o específicos de tejido (*Chung y Levens, 2005*). Por lo tanto, la suma de múltiples señales es la que determinará, en cada momento, si *C-MYC* es o no expresado. Sin embargo, los elementos reguladores conocidos del promotor no son suficientes para inducir la expresión de *C-MYC* en ratones transgénicos (*Lavenu et al., 1994*) o tras una transfección estable (*Polack et al., 1991*). La regulación apropiada de la expresión de *C-MYC* necesita, además de los promotores conocidos, de elementos de control adicionales no definidos localizados fuera de las 50 kb de secuencia de ADN que cubren tanto la región codificante de *C-MYC* humano como aproximadamente 20 kb de secuencias

flanqueantes ubicadas por delante y por detrás del gen (*Mautner et al., 1996*). Un posible elemento regulador común ha sido encontrado a 60 kb delante de la región codificante de *C-MYC* y se han descubierto varios elementos reguladores posibles entre 30 y 400 kb por detrás de la región codificante (*Mautner et al., 1996*).

c) Regulación de la elongación de la transcripción. La síntesis de un transcrito primario de ARN requiere que la ARN polimerasa II (Pol II) inicie, elongue y termine la transcripción. Uno de los mecanismos principales de control de la transcripción de *C-MYC* y de varios otros genes es a través del bloqueo de la elongación, llamado también atenuación o pausa, que detiene la transcripción en sus comienzos, generando así transcritos truncados (*Krumm y Groudine, 1995; London et al., 1991*). De esta manera, el control de la pausa de la Pol II proporciona una forma rápida de regulación de la transcripción de *C-MYC* en respuesta a estímulos diversos (*Marcu et al., 1992; Marcu et al., 1997; Spencer y Groudine, 1991*). Durante esta pausa, la Pol II permanece unida al promotor, lo que facilita la reanudación de la transcripción ante una señal adecuada. La terminación prematura de la transcripción de *C-MYC* humano a partir del promotor P2 tiene lugar cerca de la unión entre el primer exón (no codificante) y el primer intrón en tres sitios diferentes (*Bentley y Groudine, 1986, 1988*). La unión de determinados factores a la Pol II aumenta o disminuye la habilidad de esta enzima para continuar la elongación a través de las secuencias que causan bloqueo de la transcripción (*Shilatifard et al., 1997; Uptain et al., 1997*).

En resumen, la regulación negativa de la transcripción de *C-MYC* incluye en primer lugar una respuesta rápida pero transitoria (control de la elongación de la transcripción) y, posteriormente, una respuesta permanente (control de la iniciación de la transcripción) que se activa solo si la señal inhibitoria de la proliferación persiste en el tiempo. Este es el caso de lo que ocurre durante la inducción de la diferenciación terminal o de la quiescencia (*Wierstra y Alves, 2008*).

La mayoría de los genes con elemento E2F conocido en el promotor son activados en (o cerca de) la transición G1/S o posteriormente. Sin embargo, aunque el gen *C-MYC* contiene elementos E2F en su región reguladora, es activado durante la salida de quiescencia (G0/G1) (*Kelly et al., 1983*) y, por lo tanto, mucho antes que los miembros de la familia RB sean fosforilados y liberen los E2F activadores. En consecuencia, si bien estudios previos han demostrado que *C-MYC* puede ser regulado por E2F, es capaz de escapar del efecto dominante represivo de los complejos E2F/familia RB durante la salida de quiescencia a través de mecanismos desconocidos. Durante el desarrollo de este trabajo hemos estudiado dichos mecanismos.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis es el estudio de la regulación de la expresión de dos genes que juegan un papel importante en la transición G0/G1 del ciclo celular: *Ccng2* (Ciclina G2) y *C-MYC*. Mientras que el primero debe ser silenciado para permitir la salida de quiescencia, la activación del segundo es clave para la progresión hacia y a través de la fase G1. Los objetivos concretos planteados fueron los siguientes:

I. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLINA G2

- 1- Determinar el patrón de expresión del gen *Ccng2* a lo largo del ciclo celular en la línea celular NIH3T3.
- 2- Identificar la/s vía/s de señalización implicada/s en la regulación de la expresión del gen *Ccng2*.
- 3- Determinar la implicación de los factores FoxO en la transcripción del gen *Ccng2*.

II. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *C-MYC*

- 1- Analizar el patrón de unión de proteínas al elemento E2F del promotor de *C-MYC*.
- 2- Caracterización bioquímica de un factor distinto de E2F (EMYCS) capaz de interactuar con el sitio E2F del promotor de *C-MYC*.
- 3- Establecer el papel que desempeña EMYCS en la regulación de la expresión del gen *C-MYC* durante la salida de quiescencia.

Materiales y Métodos

1. CÉLULAS

1.1. CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares humanas X50-7 (línea linfoblastoide B), DG75 (linfoma de Burkitt), Mutu-1 (linfoma de Burkitt), Bjab (linfoma B), Jurkat (leucemia T), Molt-4 (leucemia T), U937 (leucemia monocítica), HL-60 (leucemia mielomonocítica), y K562 (eritroleucemia) se cultivaron en medio RPMI 1640 (*Gibco*), mientras que las líneas U2OS y Saos-2 (ambas de osteosarcoma), HeLa (carcinoma de cervix), y NIH3T3 (fibroblastos inmortalizados de ratón) se crecieron en medio DMEM (*Gibco*). Ambos medios se suplementaron con 10% de suero de ternera fetal (FCS) inactivado por calor (*Gibco*), 100U/ml de penicilina (*Laboratorios Ern S.A.*), 100µg/ml de estreptomicina (*Laboratorios Reig Jofré S.A.*), y 2mM de L-glutamina (*Gibco*). Todas las líneas celulares se crecieron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

Los linfocitos de sangre periférica se obtuvieron mediante gradiente de Ficol (*Campanero et al., 1993*) a partir de sangre periférica proporcionada por el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. La activación de estas células se llevó a cabo con 5µg/ml de Leucoaglutinina (*Sigma*) y 50U/ml de Interleuquina-2 (IL-2) (donada generosamente por NIH AIDS, Research and Reference Reagent Program; Germantown, MD, USA).

1.2. TRANSFECCIONES

Las células adherentes U2OS, Saos2, y 293-T se transfectaron en placas de 100mm de diámetro empleando el método del fosfato cálcico (*Campanero y Flemington, 1997*), mientras que las células DG75, Jurkat, K562, y Mutu-1 se transfectaron por electroporación (*Campanero y Flemington, 1997*). Para los ensayos luciferasa, se transfectaron 5µg del plásmido reportero de luciferasa apropiado, más 1µg de pCMV-βgal (plásmido de expresión de βgalactosidasa) y 24µg de plásmido de relleno [Bluescript (*Stratagene*)].

Los linfocitos T de sangre periférica se recogieron y resuspendieron a una densidad de 1x10⁸ células/ml en medio RPMI 1640, se electroporaron según la técnica descrita previamente (*Alcami et al., 1995*), se sembraron en 2 placas de 35mm de diámetro, se incubaron en RPMI con 10% de FCS a 37°C y se activaron o no con 5µg/ml de Leucoaglutinina (*Sigma*) más 50 U/ml de IL-2 durante 24h. La transfección de los linfocitos se realizó con 40µg de los plásmidos reporteros pEnh-Eµ-CMYC y 5µg de pRL-SV40 (plásmido de expresión de luciferasa Renilla, *Promega*).

Las células NIH3T3 se transfectaron con Lipofectamina Plus (*Gibco*) siguiendo las recomendaciones del fabricante, utilizando 10µg de plásmido. El día anterior a la transfección, 4.5 x 10⁶ células se sembraban en placas de 150mm de diámetro.

1.3. SINCRONIZACIÓN CELULAR

Para los estudios cinéticos, las células NIH3T3 se sincronizaron mediante crecimiento hasta confluencia en medio completo (DMEM/10% FCS), se mantuvieron confluentes 48h (para asegurar la inhibición por contacto) y luego se liberaron mediante re-sembrado a menor densidad celular (1:3) en medio completo. A continuación las células se cultivaron a 37°C, se recogieron a los tiempos indicados y se examinaron.

Alternativamente, las células se sincronizaron en distintas fases del ciclo celular:

Para detener el ciclo en la fase G0, células al 80% de confluencia se cultivaron 18-20h en ausencia total de suero (para privarlas de estímulo mitogénico) en medio DMEM suplementado con 0.1% de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA) (*New England Biolabs*). Mediante citometría de flujo se comprobó que aproximadamente el 80-90% de las células se encontraba en fase G0/G1.

Para enriquecer el cultivo en células en fase G1 temprana, las células detenidas en fase G0 como se acaba de indicar, fueron a continuación incubadas en medio completo durante 1-3h.

Para detener el ciclo en fase G2, cultivos al 80% de confluencia se incubaron 23h con 5µM de etopósido (*Sigma*). El análisis mediante citometría de flujo demostró que el 70-80% de las células se encontraban en fase G2/M.

Para enriquecer el cultivo en células en fase M, se añadió 100ng/ml de Colcemida (*Gibco*) a un cultivo en crecimiento exponencial al 80% de confluencia y se incubó durante 23h, obteniéndose aproximadamente un 80% de células en fase G2/M.

1.4. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Tras recoger las células, éstas se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se resuspendieron a continuación en 50µl de solución de detergente (*DNA-Prep, Beckman Coulter*) por millón de células. Por último, se tiñeron con 500µl de solución de yoduro de propidio con ARNasa (*DNA-Prep, Beckman Coulter*) por millón de células durante 30min a 37°C. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo empleando un citómetro *EPIC-XL* (*Beckman Coulter*). La proporción de células en cada fase del ciclo celular se determinó con el programa *Cell Quest* (*Becton Dickinson*).

2. PLASMIDOS Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES

2.1. ESTUDIOS SOBRE CICLINA G2

Para realizar los ensayos reporteros, la región del promotor murino del gen *Ccng2* (AF079877), que contiene los motivos consenso FoxO, se obtuvo mediante PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos cebadores:

Cebador directo (nucleótidos 986-1007): 5'-TCATTTTCGGAGAGGCTAGCTG

Cebador reverso (nucleótidos 1314-1337): 5'-ATATCTAATAAGTGTGCTTCTAG

Las bandas amplificadas mediante PCR se subclonaron en el vector pGL3-promoter (*Promega*), generándose el plásmido pGL3-promotor ciclina G2 (**pGL3-cicl.G2p**).

El resto de las construcciones utilizadas se resumen en la siguiente tabla:

PLASMIDO	FUENTE
pSG5-myc-p110caax	(Jimenez et al., 1998)
pMT2-HA-ΔDB -AFX	(Medema et al., 2000)
pECE-HA-FoxO3a	(Brunet et al., 1999)
pECE-HA- FoxO3a-A3	(Brunet et al., 1999)
pMT2-HA-FoxO4	(Kops et al., 1999)
pMT2-HA-FoxO4-A3	(Kops et al., 1999)
FHRE-Luc-FasLp	(Brunet et al., 1999)
pHX-Luc-mycp	(Takeshita et al., 1997)

2.2. ESTUDIOS SOBRE C-MYC

pBG-LUC se generó clonando la caja TATA del gen de la β-globina por delante del gen de la luciferasa en el plásmido pGL2-Basic (*Promega*) (*Campanero et al., 2000*). Para generar la versión silvestre (silv) del plásmido **2xE2Fmyc-BG-LUC** (que presenta 2 copias del sitio de unión a E2F del promotor de *C-MYC*) y los distintos mutantes de este sitio, las secuencias anilladas de los oligonucleótidos 2xE2Fmyc-silv directa 5'-GCGTGAGGCTTGGCGGGAAAAAGAGAGGCTTGGCGGGAAAAAGAA y reversa 5'-GATCTTCTTTTCCCGCCAAGCCTCTCTTTTCCCGCCAAGCCTCA, o bien la secuencias de los mutantes 2xE2Fmyc-E2F, 2xE2Fmyc-sp, o 2xE2Fmyc-nulo se ligaron a pBG-LUC inmediatamente por delante

de la caja TATA del gen de la β -globina. Los oligonucleótidos mutantes 2xE2Fmyc, presentaban las mutaciones puntuales indicadas en la **figura 14C**.

Para generar el plásmido **pGL2-Myc-silv**, se subclonó un inserto de ADN que abarca los promotores P1 y P2 (-274 a +66 relativo al sitio de inicio de la transcripción de P2) en pGL2-Basic (*Promega*) desde el plásmido 157mycCAT (*DesJardins y Hay, 1993*), donado gentilmente por Ed DesJardins (University of Chicago; Chicago, IL). Los distintos mutantes del sitio E2F (**Fig. 14C**) se generaron mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit *Bio-Rad Muta-Gene*, según protocolo descrito previamente y especificaciones del fabricante (*Campanero et al., 1999*). La presencia de las mutaciones apropiadas se verificó mediante el análisis de secuencia. El plásmido **pE μ -Myc** se generó subclonando el enhancer E μ de la cadena pesada de las inmunoglobulinas inmediatamente delante del promotor de *C-MYC* silvestre (o de sus mutantes) en pGL2-Myc, desde el plásmido E μ SV-Vector, cedido gentilmente por Carlos Martínez-A (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid). Los cassettes E μ -Myc silvestre (y sus mutantes del sitio E2F) se transfirieron desde pE μ -Myc a pGL2-Enhancer, que contiene el enhancer SV40 detrás del ADNc de luciferasa, para generar **pEnh-E μ -Myc**.

3. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

3.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES

Los extractos nucleares se prepararon utilizando una versión modificada del protocolo descrito por Dignam y col. (*Dignam et al., 1983*). Las células se recogieron y lavaron con PBS y el sedimento (pellet) se resuspendió en 5 volúmenes de tampón A hipotónico suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (10mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 5mM dithiothreitol (DTT), 0.5mM NaF, 0.5mM Na₃VO₄, 0.5mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml pepstatina, 1 μ g/ml epibestatina). La suspensión celular se incubó 1h en hielo y las células se lisaron posteriormente mediante 25 golpes con un homogenizador Dounce. Los núcleos se sedimentaron mediante centrifugación durante 10 segundos a 14.000xg, se lavaron una vez en tampón A y se resuspendieron en 3 volúmenes de tampón B suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (20mM HEPES pH 7.9, 20% glicerol, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 5mM DTT, 0.5mM NaF, 0.5mM Na₃VO₄, 0.5mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml pepstatina, 1 μ g/ml epibestatina). Tras incubar los lisados 30 minutos en hielo (lisis nuclear y separación de las proteínas unidas a la cromatina), los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 4°C y 14.000xg y los sobrenadantes se separaron en alícuotas y almacenaron a -80°C.

3.2. ANÁLISIS DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)

Estos ensayos se realizaron utilizando oligonucleótidos de doble hebra marcados radiactivamente. Las secuencias (5' a 3') se detallan a continuación:

A) Para los experimentos con el gen *Ccng2*, los siguientes oligonucleótidos fueron obtenidos de *Genotech*:

FoxO-Ccng2

Directo: 5'-ATAGAAAGTAAACAAACAAACAAACAAAC

Reverso: 5'-GTTTTGTTTGTGTTGTTTGTGTTTACTTTCTAT

FoxO-consenso (*Zhang et al., 2002*)

Directo: 5'-CTAGATGGTAAACAACCTGTGACTAGTAGAACACGG

Reverso: 5'-CCGTGTTCTACTAGTCACAGTTGTTTACCATCTAG

B) Para el estudio sobre *C-MYC*, se utilizaron oligonucleótidos obtenidos de *Invitrogen*, que portan las secuencias de los elementos E2F de los siguientes promotores:

E2Fdhfr-silv directo: 5'-CTAGAGCAATTTGCGGCCAAACTTG

E2Fdhfr-silv reverso: 5'-GATCCAAGTTTGGCGCGAAATTCGT

E2Fdhfr -mut directo: 5'-CTAGAGCAATTGCTCGACCAACTTG

E2Fdhfr -mut reverso: 5'-GATCCAAGTTGGTCGAGCAATTGCT

E2Fe2f1-p directo: 5'-CTAGAGCTCTTTGCGGCGAAAAAGGAG

E2Fe2f1-p reverso: 5'-GATCCTCCTTTTGGCGCGAAAGAGCT

E2Fe2f1-d directo: 5'-CTAGAGGATTTGGCGCGTAAAAGTGG

E2Fe2f1-d reverso: 5'-GATCCCACTTTTACGCGCCAAATCCT

E2Fcdc2 directo: 5'-CTAGATTTCTTTGCGGCTCTAGCCG

E2Fcdc2 reverso: 5'-GATCCGGCTAGAGCGCGAAAGAAAT

E2Fmyc-silv directo: 5'-CTAGAGAGGCTTGGCGGGAAAAAG

E2Fmyc-silv reverso: 5'-GATCCTTTTCCCGCCAAGCCTCT

E2Fmyb directo: 5'-CTAGACAGATTTGGCGGGAGGGGGG

E2Fmyb directo: 5'-GATCCCCCCTCCCGCCAATCTGT

Para los mutantes de E2Fmyc se emplearon las mutaciones puntuales mostradas en la [figura 14C](#).

También se emplearon oligonucleótidos que unen o no ETS-1 y ETS-2 (PEA3-silv y PEA3-nulo, respectivamente), según se había descrito previamente (*Wasylyk et al., 1990*) y secuencias que

interaccionan predominantemente con homodímeros y heterodímeros de STAT1 y STAT3 (el elemento inducible c-sis de alta afinidad (SIE) m67) (*Ooi et al., 1998*) o con isoformas de STAT5 (el elemento de respuesta a prolactina (PRE) del gen de la β -caseína de rata) (*Ooi et al., 1998*). También se utilizaron oligonucleótidos que unen miembros de la familia NFAT (el sitio NFAT distal del promotor de IL-2 humana) (*Iniguez et al., 2000*). Las secuencias de estos oligonucleótidos (5' a 3') son las siguientes:

PEA3-silv directo: 5'-CTAGATCGAACTTCCTGTCGAG

PEA3-silv reverso: 5'-GATCCTCGAGCAGGAAGTTCGAT

PEA3-nulo directo: 5'-CTAGATCGAACTTCTTGCTCGAG

PEA3-nulo reverso: 5'-GATCCTCGAGCAAGAAGTTCGAT

PRE directo: 5'-GATCACTTCTTGGAATTAAGGGA

PRE reverso: 5'-GATCTCCCTTAATTCCAAGAAGT

SIE directo: 5'-GATCGACATTTCCCGTAAATCG

SIE reverso: 5'-GATCCGATTTACGGGAAATGTC

NFAT directo: 5'-GATCGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT

NFAT reverso: 5'-GATCCACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCTCC

Las hebras complementarias de los oligonucleótidos mencionados se mezclaron en una relación equimolecular en tampón Tris 10mM pH 7.5 – 50mM NaCl, se calentaron a 65°C y se anillaron mediante enfriamiento lento hasta temperatura ambiente. Los oligonucleótidos de doble cadena generados (200ng) se marcaron mediante la reacción de Klenow (*Campanero et al., 1999*). Brevemente, 200ng de oligonucleótido anillado se incubaron 15 min a 37°C con 2µl del fragmento Klenow (exo-) de la ADN polimerasa (*New England Biolabs*) en presencia de 2mM de dATP, dGTP y dTTP (*Biomedical*), 50µCi de [α -³²P]dCTP (*Perkin Elmer*) y tampón MRB 1X (10mM Tris pH 7.5, 50mM NaCl, 0.1M MgCl₂ y 10mM DDT) en un volumen final de 20µl. En el caso del estudio de ciclina G2, debido a que los oligonucleótidos generados no tenían extremos protuberantes, el marcaje se realizó con la enzima T4-Polinucleótidoquinasa (*New England Biolabs*), utilizando [γ -³²P]dATP (*Perkin Elmer*), y las muestras se incubaron 30min a 37°C. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante cromatografía de exclusión empleando columnas Sephadex G25 (*Amersham*) en ambos casos.

Las reacciones de unión ADN-proteína se realizaron mezclando 3µl (15µg) de extracto nuclear, 7µl de tampón D (20mM HEPES pH 7.9, 20% glicerol, 0.1M KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT), 20µg de albúmina sérica bovina (*New England Biolabs*), 2µg de ADN de esperma de salmón fragmentado (*Invitrogen*) en un volumen final de 20µl. A esta mezcla inicial también se añadieron, si correspondía, oligonucleótidos competidores no marcados (100ng) o anticuerpos (2µg de anticuerpos purificados o 2µl de anticuerpos policlonales crudos). Tras 20 minutos de preincubación a temperatura ambiente, se añadió 1ng de sonda marcada radiactivamente y las mezclas se incubaron 20min adicionales. Las

muestras se cargaron a continuación en un gel no desnaturizante de acrilamida 4% (*National Diagnostics*)- bisacrilamida 0.1% (*National Diagnostics*), en buffer TBE 0.5X (45mM Tris, 32.3mM ácido bórico, y 1.25mM EDTA pH 8.3). Tras su secado, los complejos ADN-proteína formados se visualizaron mediante autorradiografía (16h a temperatura ambiente).

3.3. ENTRECRUZADO POR LUZ ULTRAVIOLETA (UV-CROSSLINKING)

Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo una modificación del protocolo de Thompson y col. (*Thompson et al., 1992*) según se describe a continuación. Se marcaron 200ng de sonda mediante reacción de relleno con Klenow, utilizando [α - 32 P]dGTP, [α - 32 P]dCTP, dATP y bromo-dUTP (*Sigma*). Las sondas que llevan BrdU incorporado se emplearon en ensayos de EMSA tal y como se ha descrito anteriormente, salvo que la reacción de unión entre los extractos nucleares y la sonda se realizó en reacción doble. Tras la electroforesis en gel de poliacrilamida 4% no desnaturizante, el gel húmedo fue expuesto a irradiación UV (500mJ/cm²) utilizando el transiluminador Stratalinker 1800 (*Stratagene*). La posición de los complejos formados se determinó mediante autorradiografía durante 2h a 4°C. Las bandas de los complejos de interés (I-IV) se cortaron del gel e hirvieron en presencia de tampón de carga 2X para electroforesis (100mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 10% glicerol y 0.16 mg/ml azul de bromofenol) y los complejos ADN-proteína se separaron directamente desde los trozos del gel mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con SDS. Las bandas resultantes se visualizaron mediante autorradiografía.

Para este ensayo se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (5' a 3'):

E2Fmyc-UV 5'-CTAGAGAGGCTTGGCGGGAAAAAAGGCTCAGTG

E2Fmyb-UV 5'-CTAGAGCAGATTTGGCGGGAGGGGGGAGGCTCAGTG

UV común 5'-GATCCACTGAGCCT

3.4. ENSAYOS DE INTERFERENCIA POR METILACIÓN

Este ensayo fue realizado según lo descrito previamente (*Campanero et al., 1999*). El oligonucleótido de doble hebra E2Fmyc silvestre utilizado en los ensayos EMSA (200ng) se marcó con 32 P exclusivamente en el extremo 3' de la hebra directa o exclusivamente en el extremo 3' de la hebra reversa, utilizando la enzima Klenow. A continuación, el ADN se metiló parcialmente en G y A durante 3 minutos con dimetilsulfato (DMS) a una concentración final de 0.05M. Las sondas metiladas y marcadas en una sola cadena fueron empleadas en ensayos de EMSA. La reacción de unión ADN-proteína, se llevó a cabo como se ha descrito previamente para los ensayos EMSA pero aumentando en 6 veces su escala de reacción y empleando 5-10x10⁶ cpm de sonda. Tras la electroforesis en gel no desnaturizante, las muestras se transfirieron a una membrana DEAE mediante transferencia semi-

seca, revelándose las bandas obtenidas mediante autorradiografía. Las bandas relevantes se cortaron, los complejos ADN-proteína fueron eluidos de las membranas y las proteínas se eliminaron mediante extracción con fenol/cloroformo. Posteriormente, el ADN fue digerido a nivel de las bases metiladas utilizando 1M Piperidina (*Sigma*) a 90°C durante 30min. Las muestras (igual número de cuentas) se fraccionaron en un gel de secuenciación al 10% de poliacrilamida con urea, utilizando TBE 1X como tampón de electroforesis. Finalmente, los geles fueron posteriormente secados y expuestos para autorradiografía.

3.5. LISIS CELULAR, SDS-PAGE E INMUNOBLOT

Células NIH3T3: se lisaron en hielo durante 30min en tampón de lisis (50mM Hepes pH 8.0, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100 como detergente y 1mM DTT), con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1mM Na₃VO₄, 5mM NaF, 10µg/ml Leupeptina, 1µg/ml Aprotinina y 1mM PMSF).

Linfocitos de sangre periférica: se lisaron en hielo durante 30min en tampón de lisis (20mM Hepes pH 7.9, 1mM EDTA, 400mM NaCl, 25% glicerol, 5mM DTT y 0.1% NP40 como detergente), con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1mM Na₃VO₄, 1mM NaF, 1µg/ml Leupeptina, 1µg/ml Aprotinina, 1µg/ml Pepstatina, 1µg/ml Epibestatina y 1mM PMSF).

La concentración proteica se determinó con el kit Dc protein assay (*BIO-RAD*) y posterior cuantificación en un espectrofotómetro. La misma cantidad de proteína de cada muestra (30-50µg) se resolvió en SDS-PAGE. A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45µm, las cuales se incubaron posteriormente en solución de bloqueo (TBS1X suplementado con 5% de leche en polvo desnatada y 2% de FCS) y se revelaron mediante incubación con los anticuerpos primarios adecuados diluidos en TBS1X suplementado con 0.05% de NaN₃ y 1% de BSA. A continuación se utilizaron los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidada, diluidos 1:14.000 en la solución de bloqueo descrita. Para la detección de quimioluminiscencia se empleó el reactivo *Western Lightning Chemoluminescence Reagent Plus* (*Perkin-Elmer*).

3.6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA FIREFLY Y RENILLA Y DE β-GALACTOSIDASA

Las células se transfectaron con el plásmido que codifica el gen reportero de luciferasa Firefly bajo el control del promotor a estudiar en cada caso, sólo o en combinación con otro plásmido que codifica el factor de transcripción que regula la expresión del promotor en estudio y un tercer plásmido utilizado para la normalización de la actividad luciferasa Firefly [β-galactosidasa o luciferasa Renilla (*Promega*)]. Los extractos celulares se prepararon en el tampón de lisis adecuado:

- 1) Los ensayos de actividad de luciferasa Firefly y Renila se realizaron empleando el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.
- 2) Para la medida de la actividad luciferasa Firefly y β -galactosidasa se utilizó el kit *Luciferase Assay System* (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La medición de la actividad β -galactosidasa se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano, utilizando 100 μ l de tampón Lac Z (60mM Na₂PO₄H, 40mM NaPO₄H₂, 10mM KCl, 1mM Mg₂SO₄) a los que se añadieron 20 μ l de la muestra y 20 μ l de 2-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG, Sigma). Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C y a continuación la reacción se detuvo con 50 μ l de Na₂CO₃. La cuantificación se realizó en un lector de ELISA a 420nm.

En ambos casos, la luminiscencia emitida se cuantificó con un luminómetro.

3.7. NORTHERN BLOT

El ARN total fue extraído con isotiocianato de guanidinio empleando el kit RNeasy (Qiagen). Las muestras se trataron con ADNasa I siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ARN total obtenido (10 μ g), aislado a partir de 5-10x10⁶ células NIH3T3, se separó mediante electroforesis en gel desnaturizante de 1% agarosa-formaldehído y se transfirió durante 16h a una membrana de nylon (*Zeta-Probe; Bio-Rad*) mediante transferencia semi-seca. Tras la exposición a luz UV se determinó la calidad del ARN y la eficiencia de la transferencia por tinción con azul de metileno (*Müllner y García-Sanz, 1997*).

La sonda utilizada para revelar la membrana se marcó con [α^{32} P]dCTP utilizando el kit Prime-It II random primer labeling kit (*Stratagene*). La hibridación se llevó a cabo con la solución de hibridación Express Hyb (*BD Biosciences*) durante 2 hs a 68°C en presencia de 10 μ g/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado (*Sigma*). La membrana se lavó a continuación 3 veces a temperatura ambiente con 2xSSC (150mM NaCl, 15mM citrato de sodio pH 7.0) más 0.05% SDS y una vez a 52°C con 0.1x SSC más 0.1% SDS. Finalmente, las bandas presentes se visualizaron mediante autorradiografía y se cuantificaron con la ayuda de un PhosphorImager (*Molecular Dynamics*).

La sonda de ciclina G2 murina (0.57 kb) fue generada por transcripción en reverso (RT-PCR) a partir de células NIH3T3. La sonda para p27^{Kip1} fue generada por digestión con *EcoRI-HindIII* del vector EXlox-mp27-FL que codifica la proteína p27^{Kip1} murina (*Polyak et al., 1994*). Como control de carga, se utilizó una sonda que hibrida con el ARNr 28S humano entre las posiciones 4205 y 4225 (5'-CGGGAGGTTTCTGTCCTCCC). Los pasos de hibridización y los lavados para esta sonda se realizaron siguiendo el protocolo detallado por Müllner y García-Sanz (*Müllner y García-Sanz, 1997*).

3.8. RT-PCR EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA

Se realizó la transcripción en reverso (RT) del ARN total extraído, seguida del análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR). Para ello, 4µg de ARN total fueron transcritos en reverso a partir de cebadores hexaméricos degenerados utilizando la transcriptasa reversa Superscript II (*Life Technologies*), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación por Q-PCR se llevó a cabo por triplicado para cada muestra con el aparato ABI PRISM 7700 (*Applied Biosystems*) utilizando el kit SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*).

Los oligonucleótidos cebadores utilizados para la amplificación fueron diseñados con el programa Primer Express (*Applied Biosystems*). La especificidad de los mismos se comprobó primero en un termociclador convencional (*Perkin Elmer*). Sus secuencias son las siguientes:

Ciclina G2 (Nº de acceso a GenBank NM_007635) amplifican un fragmento de ADN de 93 pares de bases (bp):

Cebador directo (nucleótidos 177-192): 5'-CCGGTCCGTGACGCC

Cebador reverso (nucleótidos 247-270): 5'-AGTTCAACAATCCGAAAAGCTGA

β-actina (Nº de acceso a GenBank NM_007393) utilizado como gen control. Amplifica un fragmento de 153 bp

Cebador directo (nucleótidos 337-357): 5'-GGCACCACACCTTCTACAATG

Cebador reverso (nucleótidos 468-490): 5'-TGGATGGCTACGTACATGGCTG

Para ambas parejas de cebadores se utilizaron las mismas condiciones:

50°C 2min (1 ciclo inicial)

95°C 10min (1 ciclo inicial)

95°C 0.15min }
67°C 1.30min } (40 ciclos)

95°C 0.15min (1 ciclo)

60°C 0.15min (1 ciclo)

95°C 0.15min (1 ciclo)

La especificidad y ausencia de contaminaciones se verificó tanto con las curvas de desnaturalización como mediante electroforesis en geles de 1.5% de agarosa. Los datos fueron analizados con el programa Dissociation Curves 1.0f. (*Applied Biosystems*). La cuantificación de los productos se basó en el registro de la fluorescencia del SYBR Green durante la fase exponencial de amplificación y la subsiguiente determinación del ciclo de PCR en el cual la señal alcanza un valor definido (Ct o *cycle threshold*). Para cada condición, la cantidad de ADNc de ciclina G2 se normalizó

respecto de la de actina y se estimó como el incremento en el Ct, es decir, las diferencias de Ct entre ciclina G2 y actina de acuerdo con la fórmula $\Delta Ct_{\text{ciclina G2}} = Ct_{\text{ciclina G2}} - Ct_{\text{actina}}$. Los datos así estandarizados se utilizaron para calcular diferencias en la expresión de ciclina G2 en células cultivadas en distintas condiciones mediante el método del $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001) normalizando los valores de inducción de cada condición respecto al de las células en G0 utilizando la fórmula: $\Delta\Delta Ct_{\text{ciclina G2}} = \Delta Ct_{\text{ciclina G2}}(G0) - \Delta Ct_{\text{ciclina G2}}(x)$. En cada experimento se analizaron triplicados de cada una de las muestras.

3.9. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

Este ensayo fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Boyd y col. (Boyd *et al.*, 1998) con mínimas modificaciones. Células NIH3T3 detenidas en la fase G2 con etopósido (como se describió previamente) y crecidas en placas de 150mm, se fijaron con formaldehído 1% en PBS durante 10min a temperatura ambiente y en agitación. Luego se añadió glicina a una concentración final de 0.125M y se incubaron 5min más. Para recoger las células, las placas se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con Tripsina durante 5 min. La Tripsina se inactivó con PBS suplementado con 20% FCS y las células se recogieron con ayuda de un rascador.

Las células se lavaron con PBS frío más 0.5mM PMSF. Posteriormente se lisaron mediante hinchamiento en tampón 5mM PIPES pH 8.0 con 0.5% NP40, 85mM KCl e inhibidores de proteasas (100mM AEBSF, 100mM Benzamidina, 1mg/ml Aprotinina, 0.1mg/ml Leupeptina, 0.1mg/ml Pepstatina, 5mg/ml TLCK y 5mg/ml TPCK). A continuación, el lisado se pasó por un homogenizador 20 veces y se centrifugó 10min a 4000 rpm a 4°C.

Los núcleos precipitados se lisaron 10min en hielo con 1% SDS en tampón 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 0.5mM PMSF y los inhibidores arriba mencionados. La suspensión se sonizó 3 veces durante 30 segundos cada vez a la máxima potencia y posteriormente se centrifugó 10min a 14000rpm. El sobrenadante, que contiene la cromatina, se conservó a -80°C en alícuotas de 100µl.

Para cada inmunoprecipitación se utilizó una alícuota que se diluyó en tampón de lisis (50mM Hepes pH 8.0, 150mM NaCl, 1% Tritón X100 y 1mM DTT), al que se le añadieron los inhibidores anteriores, y se preclarificó 2 veces con *Estafilococo A*. Antes de su uso, las células de *Estafilococo A* se bloquearon con 1µg/µl de ADN de esperma de salmón fragmentado más 1µg/µl BSA durante al menos 1h a 4°C. A continuación, la muestra se incubó con 4µg de anti-FoxO3a, con suero normal de conejo (como control de inmunoprecipitación) o sin anticuerpo, durante 18h a 4°C en rotación. Se añadieron luego 20 µl de *Estafilococo A* y se incubó durante 45min adicionales.

Antes del primer lavado se separó el sobrenadante de la reacción que no contenía anticuerpo primario (Input). Los inmunocomplejos se lavaron 2 veces con tampón 20mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% Tritón X100, 2mM EDTA y 150mM NaCl; 2 veces con tampón 20mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Tritón

X100, 2mM EDTA y 150mM NaCl; 4 veces con tampón 20mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Tritón X100, 2mM EDTA y 500mM NaCl; y 1 vez con tampón TE (10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA).

Para separar los complejos cromatina-anticuerpo del *Estafilococo A*, las muestras se incubaron en agitación fuerte 2 veces consecutivas con tampón 50mM de NaHCO₃ más 1% SDS durante 15min y se centrifugaron 5min a 14000rpm. Los sobrenadantes se trataron con ARNasa y 5M NaCl a 65°C durante 18h para eliminar el ARN presente en las muestras y romper las interacciones proteína-cromatina. La suspensión obtenida se precipitó con etanol y se trató con Proteinasa K (0.5µg/ml) para eliminar las proteínas. Finalmente se purificó el ADN mediante extracción con fenol/cloroformo y se precipitó con acetato de sodio/etanol. El ADN precipitado se resuspendió en agua y se utilizó para las reacciones de PCR. Los oligonucleótidos utilizados (5´-3´) para cada uno de los promotores analizados fueron los siguientes:

Ciclina G2: 5´-ATTCATGAAGGCTCTAAGTTA y 5´-GTTATTAAGCTGACACCTCTC

Ciclina D3: 5´-GCCCTCTGTCTTCAAAGTG y 5´-TAAGGTCACCTGTCTGCTTC

4. INMUOFLUORESCENCIAS

Immunotinción de *FoxO3a*: las células se crecieron en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina y L-laminina y se mantuvieron en crecimiento exponencial hasta alcanzar el 60-70% de confluencia. A continuación se retiró el suero durante 18h (G0) o se retiró el suero y luego se estimularon 1h con 10% de FCS (G1). Las células se fijaron 1h a temperatura ambiente con 3 partes de 100mM lisina-HCl, 50mM NaH₂PO₄.H₂O, 10mM Na-m-periodato pH 7.4 y 1 parte de paraformaldehído 8% clarificado con NaOH.

Las células fijadas se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon 20min con suero de conejo 1.5% en TBS-saponina (25mM Tris, 0.9% NaCl, 0.02% saponina) y se bloquearon con 5% de leche desnatada en TBS-saponina a 37°C. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-FoxO3a a una dilución 1:50 en TBS-saponina con leche desnatada al 5% y Azida sódica al 0.05%, durante 18h a 4°C en una cámara húmeda. Se lavaron 4 veces durante 15min con TBS-saponina con leche desnatada al 5% y azida sódica al 0.05% y una vez con TBS-saponina. A continuación, las células se incubaron 1h en la oscuridad con el anticuerpo secundario apropiado unido al fluorocromo Cy3. Luego se lavaron 3 veces con TBS-saponina y 1 vez con TBS. Por último se montaron sobre portaobjetos, se sellaron y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia.

5. ANTICUERPOS Y REACTIVOS

Además de los reactivos mencionados a lo largo de este apartado, se utilizaron los siguientes:

Reactivo	Concentración	Fuente
PDGF (platelet-derived growth factor)	15ng/ml	<i>Upstate Biotech.</i>
IGF-1 (insulin like growth factor 1)	20ng/ml	<i>Pharmacia</i>
PA (egg yolk phosphatidic acid)	100μM	<i>Sigma</i>
LPA (1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate sodium salt lysophosphatidic acid)	10ng/ml	<i>Avanti</i>
LY294002	10μM	<i>Calbiochem</i>
PD98059	2μM	<i>Calbiochem</i>
SDF-1 (<i>stromal cell derived factor-1</i>)	50ng/ml	<i>Peprotech EC</i>
IL-4 (interleukin-4)	0.2 ng/ml	<i>Peprotech EC</i>

La tabla 2 recoge los anticuerpos utilizados en los diferentes experimentos:

Antígeno	Origen	Fuente
hemaglutinina (HA)	monoclonal de ratón	<i>Babco</i>
α -tubulina DM1A	monoclonal de ratón	<i>Calbiochem</i>
p27 ^{Kip1}	monoclonal de ratón	<i>Pharmingen</i>
FoxO3a (FKHRL)	policlonal de conejo	<i>Upstate Biotechnology</i>
ciclina D3	policlonal de conejo	<i>Transduction Laboratories</i>
Fosfo-PKB (Ser473)	policlonal de conejo	<i>Cell Signaling</i>
PKB	policlonal de oveja	<i>Upstate Biotechnology</i>
Fosfo-ERK (9101)	policlonal de conejo	<i>Cell Signaling</i>
ERK (9102)	policlonal de conejo	<i>Cell Signaling</i>
p130 (sc-317X)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
p107 (sc-318X)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
pRB (sc-50X)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
E2F1 (sc-193x)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
E2F2 (sc-632x)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
E2F3 (sc-879x)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
E2F4 (sc-512x)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
E2F5 (sc-1699x)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
E2F6 (sc-22825x)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
E2F7A (BCN4774)	policlonal de conejo	<i>AntibodyBcn (España)</i>
E2F7B (BCN4775)	policlonal de conejo	<i>AntibodyBcn (España)</i>
E2F7A y E2FB (BCN4776)	policlonal de conejo	<i>AntibodyBcn (España)</i>
DP1 A33	policlonal de conejo	<i>(Campanero et al., 1999)</i>
c-Myc (Mab) 9E10	monoclonal de ratón	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Maz (M05)	policlonal de conejo	<i>Abnova</i>
STAT3 (sc-482x)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
STAT5 (sc-835x)	policlonal de conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
NFAT 1, 2, 3 y 4 (Anti-allNFAT)	policlonal de conejo	<i>(Iniguez et al., 2000)</i>
suero preimmune PI A33	policlonal de conejo	<i>(Campanero et al., 1999)</i>
Conejo-HRP A1949	policlonal de cabra	<i>Sigma</i>
Ratón-HRP A2304	policlonal de cabra	<i>Sigma</i>
Cabra-HRP A9452	policlonal de conejo	<i>Sigma</i>

Resultados

I. CICLINA G2

1. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE CICLINA G2 A LO LARGO DEL CICLO CELULAR

Se ha descrito previamente que los niveles del ARNm de ciclina G2 varían a lo largo del ciclo celular en linfocitos, exhibiendo valores máximos de expresión en la fase S/G2 (*Horne et al., 1996; 1997*). En esta tesis nos propusimos estudiar los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de esta ciclina a lo largo del ciclo celular. Para ello comprobamos, en primer lugar, si la expresión del gen *Ccng2* también se regula a lo largo del ciclo celular en otros tipos celulares, en concreto, en la línea celular de fibroblastos murinos NIH3T3. Para ello, las células se detuvieron en la fase G0 mediante dos procedimientos alternativos (crecimiento hasta confluencia o privación de suero, véase Materiales y Métodos) y posteriormente se indujo su salida de quiescencia de forma sincronizada durante diferentes tiempos.

1.1. Diferenciación de las fases G0 y G1 del ciclo celular

Debido a que las fases G0 y G1 son indistinguibles mediante análisis del contenido de ADN, para discriminar entre ellas examinamos diferentes parámetros. Por un lado estudiamos la activación de PKB mediante fosforilación, la cual es inducida rápidamente cuando las células entran en la fase G1 del ciclo (*Alvarez et al., 2001*). Tanto en las células sincronizadas por crecimiento hasta confluencia, como en aquellas privadas de suero, PKB se encontraba defosforilado, pero esta modificación aumentó rápidamente tras el estímulo inductor de la salida de quiescencia (**Fig 1A y B**).

Asimismo, examinamos los niveles de ciclina D3, una proteína cuya expresión aumenta gradualmente en G1 (*Sherr, 1995*). Observamos que los niveles de la misma eran casi indetectables en células quiescentes y a una hora después del estímulo inductor, y que alcanzaron niveles máximos tras 14-18h de proliferación (**Fig 1A**), coincidiendo con la fase G1 y la transición G1/S según análisis por citometría de flujo (**Fig 1A**).

Por otro lado, determinamos los niveles de la proteína p130, los cuales son altos en células quiescentes y disminuyen a medida que las células progresan a través de la fase G1 (*Smith E. J. et al., 1996*). Como se puede apreciar, los niveles de p130 no disminuyeron de forma evidente hasta las 10-14 horas de estimulación en células sincronizadas por crecimiento hasta confluencia (**Fig. 1A**), mientras que apenas se observan cambios en células sincronizadas por privación de suero a los tiempos estudiados (**Fig. 1B**).

Otro método empleado para discriminar entre células en fase G0 y G1 del ciclo consiste en examinar la localización intracelular de los factores de transcripción FoxO. Como hemos mencionado previamente, estos factores se localizan en el núcleo cuando las células se encuentran en estado

quiescente (G0) pero, una vez que son estimuladas con mitógenos, PKB fosforila a los factores FoxO, lo cual induce su salida del núcleo e inactivación (*Brunet et al., 1999; Biggs et al., 1999; Rena et al., 1999; Kops et al., 2002*). Como se observa en la **figura 1C**, las células carentes de suero presentaban una localización nuclear de los factores FoxO, mientras que las células inducidas con suero, presentaron una localización citoplasmática de los mismos.

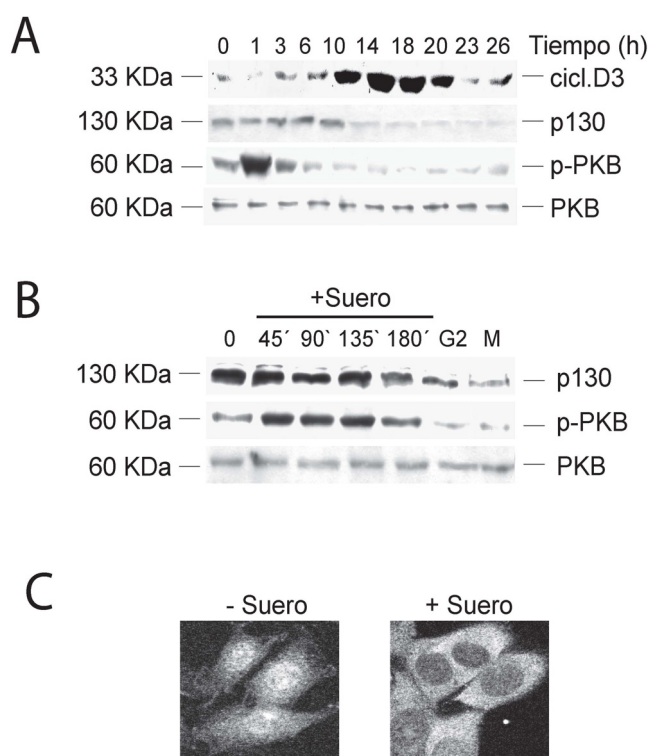


Figura 1. Tanto el crecimiento hasta confluencia como la privación de suero detienen las células NIH3T3 en G0. (A-B) Análisis mediante Inmunoblot de la expresión de ciclina D3 (cycl.D3), p130 (p130), fosfo Ser473-PKB (p-PKB) o PKB (PKB) en extractos de células NIH3T3 sincronizadas. **(A)** Células NIH3T3 se detuvieron en G0 mediante crecimiento hasta confluencia durante 48h, se liberaron posteriormente mediante siembra a baja densidad en presencia de suero al 10% y se cultivaron durante los tiempos indicados. **(B)** Células NIH3T3 se cultivaron en ausencia de suero durante 18-20h (tiempo 0) o bien, en ausencia de suero y luego se incubaron en medio con suero durante diferentes tiempos (indicados en minutos), o bien se detuvieron en fase G2 mediante cultivo en presencia de etopósido 5μM durante 23h o en fase M mediante el cultivo en presencia de colcemida 100ng/ml 23h. **(C)** Inmunofluorescencia representativa con anticuerpo anti-FoxO3a de células NIH3T3 privadas de suero durante 18h y estimuladas (+ suero) o no (- suero) durante 1h.

Todos estos datos confirman que tanto las células detenidas por confluencia como aquellas privadas de suero se encontraban en la fase G0 de ciclo celular.

1.2. Los niveles de expresión del ARNm de ciclina G2 varían a lo largo del ciclo celular en fibroblastos NIH3T3

En un primer abordaje, se detuvieron las células NIH-3T3 en la fase G0 mediante crecimiento hasta confluencia y posteriormente se indujo su salida de quiescencia de forma sincronizada mediante siembra a baja densidad en presencia de suero durante diferentes tiempos. La **figura 2A** muestra los perfiles del ciclo celular a 0, 18 y 23h tras la liberación, cuando una proporción significativa de células se encontraba en fase G0/G1 (0h), S (18h) o G2/M (23h). El análisis mediante Northern Blot mostró niveles elevados de ARNm de ciclina G2 antes de la liberación de las células (G0, 0h), que

disminuyeron al salir las células de quiescencia (fase G1) y aumentaron nuevamente tras 18-20h de cultivo a baja densidad celular, coincidiendo con la fase S tardía y G2/M) (Fig. 2B).

Para confirmar estos resultados y para determinar si el aumento de los niveles de ARNm de ciclina G2 observados en G2/M ocurría específicamente en la fase G2 o en la M, utilizamos como segunda aproximación el estudio de cultivos enriquecidos en distintas fases del ciclo celular. Para detener las células en G0, éstas se cultivaron en un medio carente de suero, tras lo cual el 90% de las células se encontraba en fase G0/G1 según el análisis mediante citometría de flujo (Fig. 2C). Las células en fase G1 se obtuvieron a partir de células detenidas en G0, mediante cultivo en presencia de suero durante distintos períodos de tiempo (45, 90, 135 y 180 minutos). Para enriquecer los cultivos en células en fase G2, éstos se trataron con etopósido, un inhibidor de la topoisomerasa II que detiene el ciclo celular en dicha fase mediante inhibición de los complejos CDK1/ciclina B (Lock y Ross, 1990). Para enriquecer los cultivos en células en la fase M, éstos se trataron con colcemida, una droga despolarizante de microtúbulos que impide la formación del huso mitótico y, por tanto, detiene las células en metafase. El análisis en paralelo de estas muestras puso una vez más de manifiesto que la expresión del ARNm de ciclina G2 es alta en células detenidas en G0, disminuyendo de manera significativa tras 45-90 minutos de la adición de suero al medio de cultivo (fase G1) y presentando también niveles elevados en células detenidas en G2, y niveles intermedios en la fase M (Fig. 2D).

Por todo ello podemos concluir que la expresión del ARNm de ciclina G2 varía a lo largo del ciclo celular en fibroblastos NIH3T3, presentando niveles elevados en las fases G0 y G2 del ciclo y una marcada reducción al acceder las células a la fase G1 del ciclo celular.

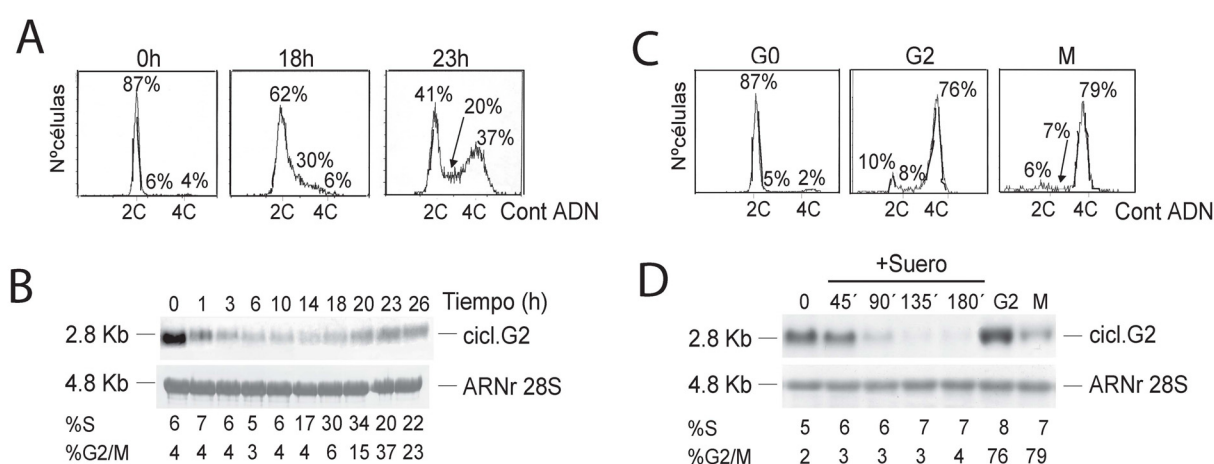


Figura 2. Los niveles de ARNm de ciclina G2 varían a lo largo del ciclo celular. (A-B) Células NIH3T3 se detuvieron en G0 mediante crecimiento hasta confluencia durante 48h. Se liberaron posteriormente mediante siembra a baja densidad en presencia de suero al 10% y se cultivaron durante los tiempos indicados. (C-D) Células NIH3T3 se cultivaron en ausencia de suero durante 18-20h (tiempo 0) o bien, en ausencia de suero y luego se

incubaron en medio con suero durante diferentes tiempos (indicados en minutos), o bien se detuvieron en fase G2 mediante cultivo en presencia de etopósido 5 μ M durante 23h o en fase M mediante el cultivo en presencia de colcemida 100ng/ml 23h. **(A y C)** Perfiles de ciclo celular representativos de células a 0, 18 y 23h tras ser liberadas de quiescencia **(A)** o de células enriquecidas en fases G0, G2 y M **(C)**, mostrando el porcentaje de células en G0/G1, S y G2/M. **(B y D)** Análisis mediante Northern Blot de la expresión de ciclina G2. ARN total (10 μ g) extraído de células NIH3T3 se incubó en presencia de sondas que hibridan específicamente con ciclina G2 o con ARNr 28S (control de carga). Debajo de cada carril se indica el porcentaje de células en fases S y G2/M. La figura ilustra un experimento representativo de 3 con resultado similar.

2. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE CICLINA G2

2.1. PDGF e IGF, pero no LPA o PA, inducen la disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2

Para elucidar cuáles son las señales involucradas en la disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2 durante la salida de quiescencia, células NIH3T3 detenidas en G0 mediante privación de suero se incubaron en presencia de suero de ternera fetal (FCS), o bien en presencia de ácido lisofosfatídico (LPA), uno de los componentes más abundantes del suero (*Ridley et al., 1992*), o ácido fosfatídico (PA), otra molécula mitogénica del suero (*Fang et al., 2001*). El suero indujo una disminución drástica de los niveles de ARNm de ciclina G2 como se describió previamente mientras que, por el contrario, ni LPA ni PA mediaron efecto alguno (**Fig. 3A**).

El suero contiene además factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento similar a insulina (IGF1). La incubación de las células detenidas en G0 en un medio conteniendo cualquiera de estos factores indujo una disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2 similar a la observada con suero (**Fig. 3B**).

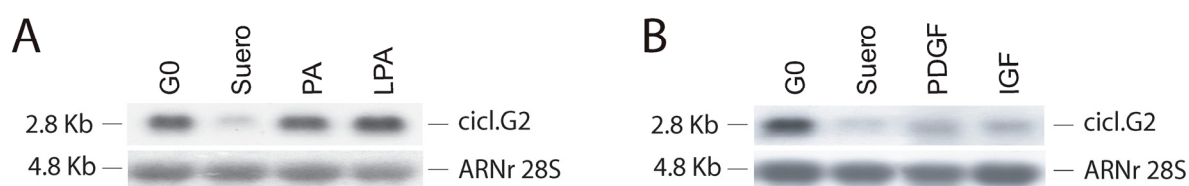


Figura 3. PDGF e IGF, pero no LPA o PA, inducen disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2. Análisis mediante Northern Blot de la expresión de ciclina G2 en ARN total extraído de células NIH3T3 incubadas con diferentes estímulos e hibridado con sondas para ciclina G2 y para ARNr 28S (control de carga). Las células se detuvieron en G0 mediante cultivo en ausencia de suero durante 18-20h y a continuación se estimularon durante 3h con 10% FCS, 10ng/ml LPA o 100 μ M PA **(A)** o bien con 10% FCS, 15ng/ml PDGF o 20ng/ml IGF **(B)**. La figura ilustra un experimento representativo de 3 con resultado similar.

2.2. La vía de señalización de PI3K induce disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2

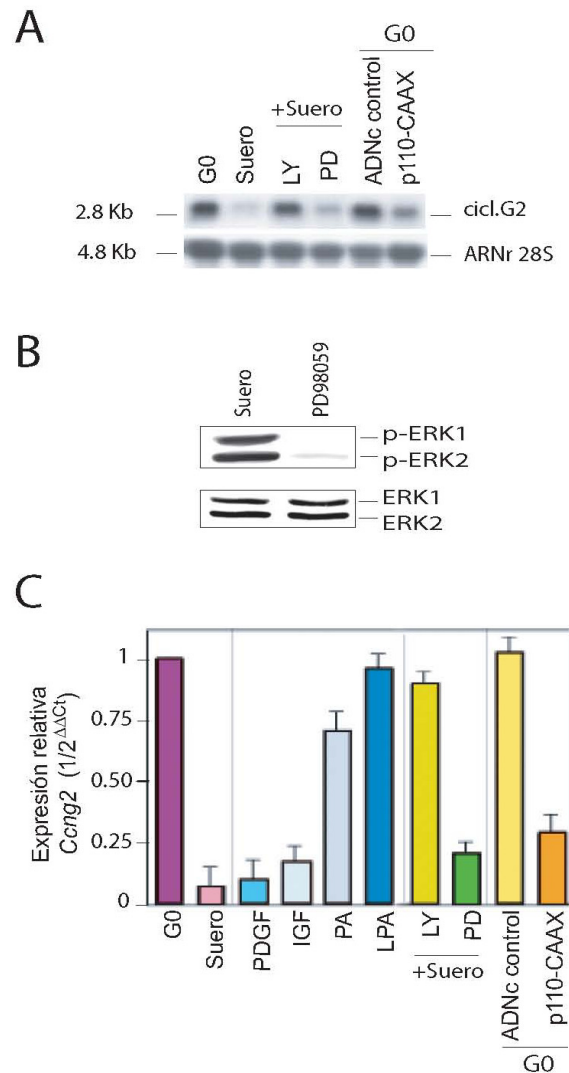
Para determinar cuál de las vías de señalización activadas por PDGF o IGF1 estaba involucrada en la regulación de la expresión de ciclina G2, se utilizaron drogas inhibitorias de las dos rutas de señalización principales activadas por dichos factores de crecimiento: la vía de PI3K y la ruta de MEK1/2 / ERK1/2. Como se observa en la [figura 4A](#), la inhibición de la vía de MEK1/2 / ERK1/2 con el inhibidor PD98059 no impidió la disminución de los niveles de ciclina G2 inducida por el suero, a pesar de que este inhibidor era activo ([Fig. 4B](#)). Por el contrario, la incubación con LY294002, un inhibidor específico de PI3K, evitó dicha disminución ([Fig. 4A](#)).

A continuación, y para confirmar estos resultados, se intentó mimetizar la activación de la ruta de PI3K en ausencia de suero. Para ello se transfectaron células NIH3T3 con una forma recombinante de la subunidad catalítica p110 α llamada p110-CAAX (*Jimenez et al., 1998; Jimenez et al., 2000*). p110-CAAX presenta el dominio CAAX de Ras, un sitio de farnesilación que permite su anclaje a la membrana de manera constitutiva y, por tanto, confiere a la enzima una actividad constitutiva e independiente de estímulo (*Klippel et al., 1996*). Como se observa en la [figura 4A](#), la expresión de p110-CAAX en células detenidas en G0 resultó en una disminución moderada de los niveles de ARNm de ciclina G2, aunque no fue tan efectiva como la inducida por suero, PDGF o IGF, quizás debido a que la eficiencia de transfección en estas células fuera de alrededor del 50-60%. Alternativamente, estos resultados podrían sugerir que la activación de la vía de PI3K es necesaria pero no suficiente para inducir la disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2 observada en G1.

La implicación de la ruta de PI3K en la regulación de la expresión de ciclina G2, así como la falta de efecto de LPA y PA sobre dicha regulación se confirmó mediante PCR cuantitativa observándose resultados similares a los obtenidos mediante Northern Blot ([Fig. 4C](#)).

En resumen, algunos mitógenos del suero tales como PDGF o IGF1, pero no PA o LPA, inducen la disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2 a través de la activación de la ruta de PI3K pero no de MEK/ERK.

Figura 4. La regulación negativa de los niveles de ARNm de ciclina G2 en la fase G1 del ciclo celular requiere la activación de PI3K. (A) Análisis mediante Northern Blot de la expresión de ciclina G2 en ARN total extraído de células NIH3T3 incubadas con diferentes estímulos e hibridado con sondas para ciclina G2 y para ARNr 28S (control de carga). Las células se detuvieron en G0 mediante cultivo en ausencia de suero durante 18-20h, se preincubaron 1 hora con 10 μ M LY294002 (LY) o con 2 μ M PD98059 (PD) y posteriormente se estimularon 3h con FCS 10%. Para la expresión transitoria de p110-CAAX las células transfectadas con un vector que codifica p110-CAAX o un ADNc control se cultivaron 8h en medio completo, para permitir la expresión del gen, y luego durante 18h en medio carente de FCS (G0) previo al análisis. (B) Análisis mediante Inmunoblot de la inhibición mediada por PD98059 de la fosforilación de las proteínas ERK1 y ERK2, utilizando alícuotas de las muestras PD y Suero (control negativo) empleadas en el panel (A) y anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2 y anti-ERK1/2 (control de carga). (C) Análisis de la expresión de *Ccng2* mediante PCR cuantitativa. Los ADNc se obtuvieron a partir de células tratadas como se indica en el panel (A) de esta figura y en la figura 3. Para cada condición se muestra la cantidad de ADNc de ciclina G2 respecto de la de actina. La expresión relativa bajo las diferentes condiciones se comparó con la de G0. En esta figura se muestra la media \pm la desviación estándar de 3 experimentos.



3. IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES FOXO EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLINA G2

3.1. FoxO3a activa la expresión del ARNm de ciclina G2

Para analizar los mecanismos por los que la activación de la vía de PI3K induce la reducción de los niveles de ARNm de ciclina G2, consideramos el hecho de que la ruta PI3K/PKB regula negativamente la actividad de los factores de transcripción de la familia FoxO (*Biggs et al., 1999; del Peso et al., 1999; Kops et al., 1999; Burgering y Kops, 2002*). Debido a que los perfiles de expresión del ARNm de ciclina G2 (*Fig. 2B y 2D*) se correlacionan con la actividad de los factores FoxO a lo largo del ciclo celular, la cual es alta en las fases G0 y G2 del ciclo (*Alvarez et al., 2001*), postulamos que los factores de transcripción FoxO podrían regular la expresión de ciclina G2.

Para confirmar esta hipótesis, células NIH3T3 fueron transfectadas con las formas silvestres de FoxO4 (FoxO4-silv) o de FoxO3a (FoxO3a-silv), o con las versiones constitutivamente activas de ambos (FoxO4-A3 o FoxO3a-A3) respectivamente (Kops *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 1999). Las formas A3 se comportan como constitutivamente activas ya que presentan los 3 residuos fosforilables por PKB mutados a Alanina, por lo que se localizan en el núcleo de forma permanente e independiente de la actividad de PKB (Brunet *et al.*, 1999). En primer lugar, comprobamos el perfil de expresión de los diferentes mutantes mediante Inmunoblot (Fig. 5A). Debido a que los factores FoxO inducen en G0 la transcripción de $p27^{Kip1}$ (Medema *et al.*, 2000), entre otros genes, analizamos la actividad transcripcional de las cuatro construcciones empleadas examinando la expresión del ARNm de $p27^{Kip1}$. Como se observa en la figura 5B, la expresión del ARNm de $p27^{Kip1}$ es alta en G0 y disminuye tras la adición de suero (control). Sin embargo, FoxO4-A3 y, sobre todo, FoxO3a-A3 indujeron el incremento de $p27^{Kip1}$ en la fase G1 del ciclo celular. A continuación analizamos los niveles del ARNm de ciclina G2: FoxO4-silv, FoxO4-A3 y FoxO3a-silv indujeron un incremento moderado de los mismos, mientras que FoxO3a-A3 potenció significativamente la expresión de ciclina G2, a pesar de la presencia de suero en el medio de cultivo (Fig.5B).

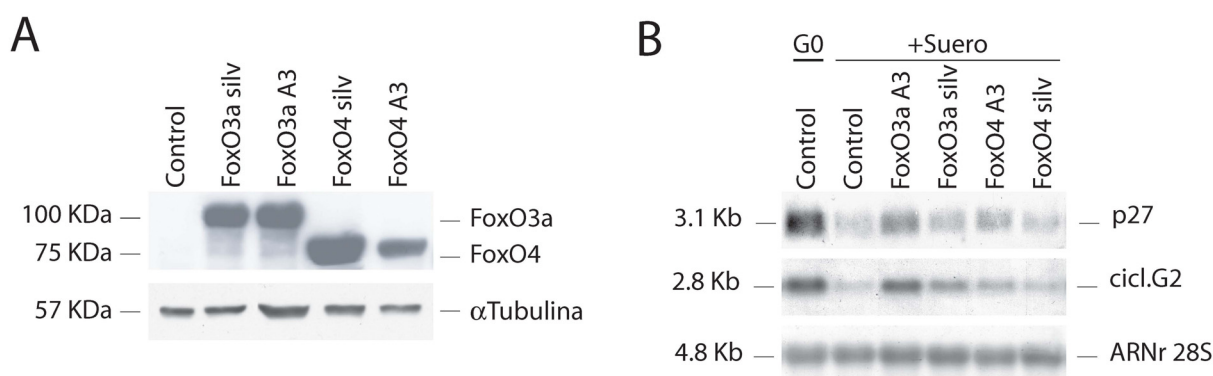


Figura 5. La activación de los factores FoxO induce la expresión del ARNm de ciclina G2. Células NIH3T3 se transfectaron con ADNc control (Control) o bien con ADNc que codifica HA-FoxO3a-silv (FoxO3a-silv) o su forma activa (FoxO3a-A3) o HA-FoxO4-silv (FoxO4-silv) o su forma activa (FoxO4-A3). (A) Análisis mediante Inmunoblot de la expresión de FoxO3a-silv, FoxO3a-A3, FoxO4-silv o FoxO4-A3 en las muestras estudiadas en el panel (B), utilizando anticuerpo anti-HA o anti α -tubulina (control de carga). (B) Las células transfectadas se cultivaron 8h en medio completo, para permitir la expresión de los ADNc transfectados y luego en medio carente de FCS durante 18h. Posteriormente fueron examinadas en G0 (solo el control) o bien estimuladas con 10% FCS durante 3h previo al análisis (+Suero). El ARN total extraído de las distintas células fue analizado mediante Northern Blot con sondas específicas para $p27^{Kip1}$, ciclina G2 o ARNr 28S (control de carga).

Para confirmar estos datos, estudiamos si la disrupción de la acción endógena de los factores FoxO afecta la expresión del ARNm de ciclina G2. Para ello se utilizó un mutante del factor de transcripción FoxO4 (Δ DBAFX) que tiene una delección del dominio de unión al ADN y que actúa como un dominante negativo (*Kops et al., 1999; Alvarez et al., 2001*). Dicho mutante fue transfectado en células NIH3T3. Tras 8h de expresión, las células se detuvieron en G0 y se examinaron los niveles de expresión del ARNm de ciclina G2. Como se observa en la **figura 6B**, la inhibición de la acción endógena de los factores FoxO mediante expresión de Δ DBAFX en G0, redujo significativamente los niveles del ARNm de ciclina G2 en esta fase del ciclo. En la **figura 6A** pueden observarse los niveles de expresión de Δ DBAFX.

De estos datos podemos concluir que los factores FoxO, principalmente FoxO3a, inducen la expresión del ARNm de ciclina G2.

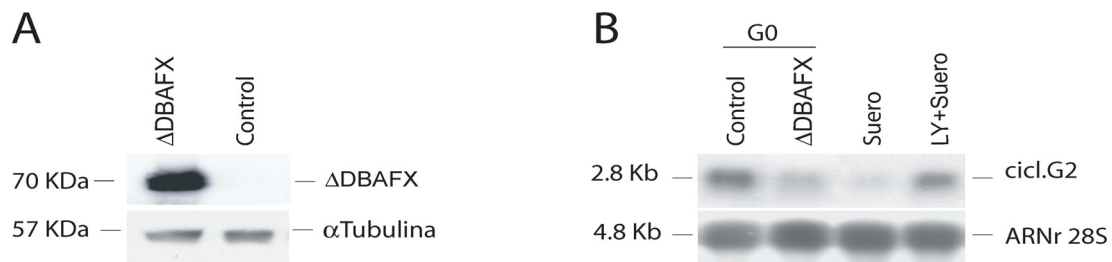


Figura 6. Un mutante que interfiere con la actividad de los factores FoxO regula negativamente la expresión del ARNm de ciclina G2 en G0. Células NIH3T3 se transfectaron con un vector control o con un vector de expresión de HA- Δ DBAFX (Δ DBAFX). **(A)** La expresión de Δ DBAFX en alícuotas obtenidas de las muestras ensayadas en el panel **(B)** fue analizada mediante Inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-HA. La expresión de tubulina fue analizada como control de carga. **(B)** Las células transfectadas se incubaron 8h en medio con suero para permitir la expresión del gen y 18h más en ausencia de suero (G0). Células control no transfectadas fueron cultivadas en ausencia de suero (18h) y luego incubadas con suero (3h) o preincubadas con LY294002 (1h) previo al tratamiento con suero. El ARN total fue examinado mediante Northern Blot con sondas para ciclina G2 y ARNr 28S (control de carga). Se muestra un experimento representativo de 3 realizados con resultado similar.

3.2. FoxO3a se une al promotor de *Ccng2*

Una vez observado que los factores FoxO regulan la expresión de ciclina G2, nos planteamos la posibilidad de que esta regulación tuviera lugar a través de la unión directa de los factores FoxO al promotor de dicho gen. El análisis del promotor de *Ccng2* murino (*Jensen et al., 1999*) reveló la presencia de varios motivos similares a los sitios consenso de unión de los factores FoxO (*Brunet et al., 1999; Zhu et al., 2000*) (**Fig.7**).

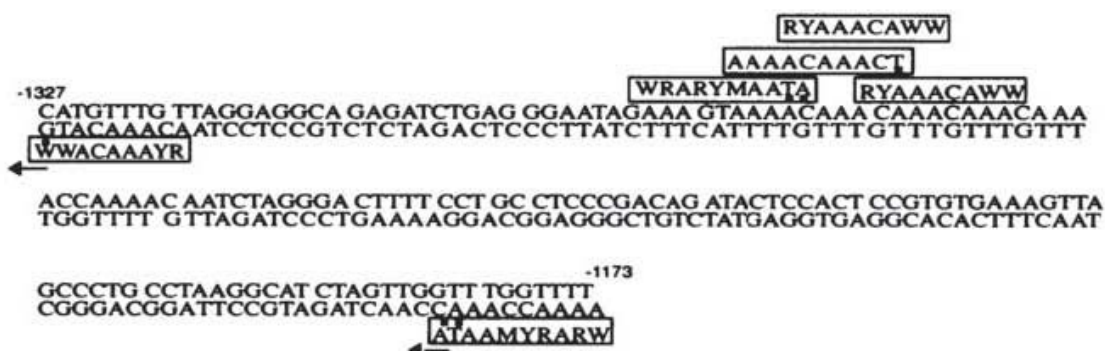


Figura 7. Región del promotor de *Ccng2* murino que contiene los motivos consenso para factores FoxO. Se observan los siguientes sitios consenso para factores FoxO: 5'-RYAAACAWW, sitio consenso de FKH1; 5'-WRARYMAATA, sitio consenso de FKH de *Xenopus*; 5'-AAAACAACT, elemento de respuesta a FKH del promotor de IGFBP1 (R=A/G, Y=T/C, W= A/T, M=A/C, K=T/G). Los puntos negros indican la existencia de nucleótidos que no coinciden con los sitios consenso. Los números indican la posición en el promotor relativa al sitio de iniciación de la transcripción que está situado en la posición 2369 del gen de *Ccng2* murino (AF079877).

Para examinar si los factores FoxO se unen a estos sitios consenso en el promotor de *Ccng2* se utilizó en primer lugar el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Para ello se generaron un oligonucleótido de doble hebra que comprendía la zona del promotor de *Ccng2* que posee los motivos FoxO [al que llamamos FoxO-*Ccng2* (bp -1296 a -1266)] y otro que contiene motivos FoxO consenso previamente descritos (FoxO-cons.) (Zhang *et al.*, 2002). En primer lugar probamos si las proteínas nucleares extraídas de extractos control de la línea celular de linfoma de Burkitt DG75 se unen a estos grupos de motivos FoxO en el promotor de *Ccng2*. Observamos que la sonda FoxO-*Ccng2* era capaz de formar complejos con proteínas de dichos extractos (Fig. 8A). Estos complejos fueron desplazados por un exceso tanto del oligonucleótido frío FoxO-*Ccng2* como del oligonucleótido FoxO-consenso (Fig. 8A). Este experimento se repitió utilizando como sonda el oligonucleótido que presenta los motivos consenso de FoxO sin competir o compitiendo bien con un exceso del mismo o con el oligonucleótido FoxO-*Ccng2*, observándose resultados similares (Fig. 8B). A continuación, extractos nucleares de células NIH3T3 en diferentes fases del ciclo celular se ensayaron con la sonda FoxO-*Ccng2*, observándose un incremento en la formación de complejos en los extractos en fases G0 y G2 del ciclo celular, en comparación con los extractos en fase G1 (Fig. 8C, carriles 1-3). La formación de dichos complejos fue eficientemente disociada en extractos en fase G2 mediante un exceso tanto del oligonucleótido frío FoxO-*Ccng2* como del oligonucleótido FoxO-consenso (Fig. 8C, carriles 4 y 5). Más aún, el anticuerpo anti-FoxO3a, pero no un anticuerpo control anti-DP1, fue capaz de producir un cambio adicional en la movilidad de estos complejos (supershift) (Fig. 8C, carriles 6-8).

A continuación se examinó si esta asociación de FoxO3a con el promotor de *Ccng2* también ocurría *in vivo*. Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando

células detenidas en fase G2 del ciclo celular. La inmunoprecipitación de cromatina mediante el uso del anticuerpo anti FoxO3a y posterior análisis mediante PCR de los fragmentos de ADN asociados evidenció la unión de FoxO3a a la región del promotor endógeno de *Ccng2* que contiene los motivos FoxO (Cicl.G2p, ilustrados en la figura 7). Como control negativo, se ensayó en paralelo el promotor de ciclina D3 (Cicl.D3p), observándose que FoxO3a no se asocia a este promotor (Fig. 8D).

En conclusión, los datos presentados apoyan un modelo en el cual los factores FoxO regulan la expresión de ciclina G2 por unión a su promotor.

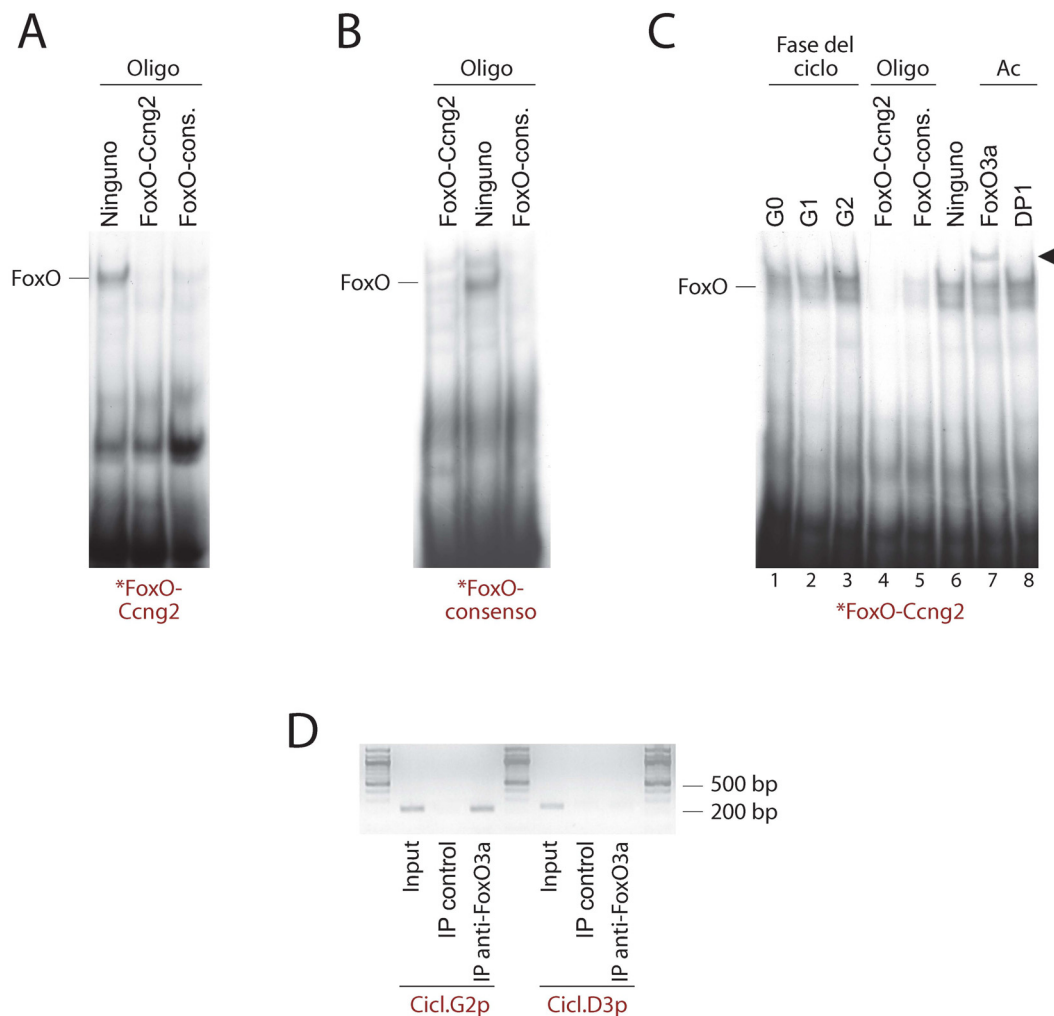


Figura 8. Los factores FoxO se unen al promotor de ciclina G2. (A-B) Los ensayos de cambio de movilidad electroforética se realizaron utilizando extractos nucleares de células DG75 y sondas que presentan los sitios de unión a FoxO del promotor de *Ccng2* (FoxO-Ccng2) (A) o una sonda con sitios consenso para FoxO (FoxO-cons.) descrita previamente (B). Las mezclas de reacción se incubaron en ausencia (Ninguno) o en presencia de un exceso de 100 veces de un oligonucleótido competidor no marcado (indicado como Oligo). (C) Células NIH3T3 fueron detenidas en las fases G0, G1 o G2 del ciclo celular como se describe en la fig. 1B. Los complejos formados por incubación de los correspondientes extractos nucleares con la sonda FoxO-Ccng2 fueron analizados (carriles 1-3). Extractos preparados a partir de células detenidas en G2 fueron incubados durante 20 minutos, antes de la adición de la sonda, con un exceso de 100 veces del oligonucleótido competidor frío (Oligo, carriles 4 y 5), sin

competidor (Ninguno, carril 6), con anticuerpo anti-FOXO3a (carril 7) o con un anticuerpo control (anti-DP1, carril 8). Se indica la posición de los complejos que contienen FoxO (línea) y el cambio de posición de los mismos por la unión del anticuerpo (punta de flecha). Se muestra aquí un experimento representativo. (D) Suspensiones de cromatina de células NIH3T3 detenidas en G2 fueron incubadas con suero normal de ratón (control de inmunoprecipitación [IP]) o con anticuerpo anti-FOXO3a. El ADN fue eluido de los inmunoprecipitados y analizado mediante PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean la región del promotor de *Ccng2* descrita en la leyenda de la fig. 7 o una región del promotor de ciclina D3 como control. Los extractos de cromatina total fueron examinados mediante PCR como control positivo (Input).

3.3. El promotor de *Ccng2* es transactivado por FoxO3a

Para evaluar si la unión de los factores FoxO a su elemento en el promotor de *Ccng2* era funcional, la región del promotor que contiene los motivos FoxO (Fig. 7) fue insertada delante del promotor basal que controla la expresión del ADNc de la Luciferasa en el vector reportero pGL3-promoter. La cotransfección de esta construcción con FoxO4-A3 o FoxO3a-A3 (sobre todo con este último), pero no con Δ DBAFX, indujo expresión del gen reportero en células en crecimiento exponencial (Fig. 9) dentro del rango previamente descrito para promotores controlados por FoxO (Alvarez et al., 2001; Brunet et al., 1999; Medema et al., 2000). Como controles, se puede observar que FoxO3a también transactiva al promotor de *FasL*, como estaba previamente descrito (Brunet et al., 1999; Alvarez et al., 2001), pero no al promotor de *C-MYC* (Takeshita et al., 1997; Alvarez et al., 2001) (Fig. 9).

Estos datos sugieren que los factores FoxO regulan la expresión de ciclina G2 mediante unión a su promotor.

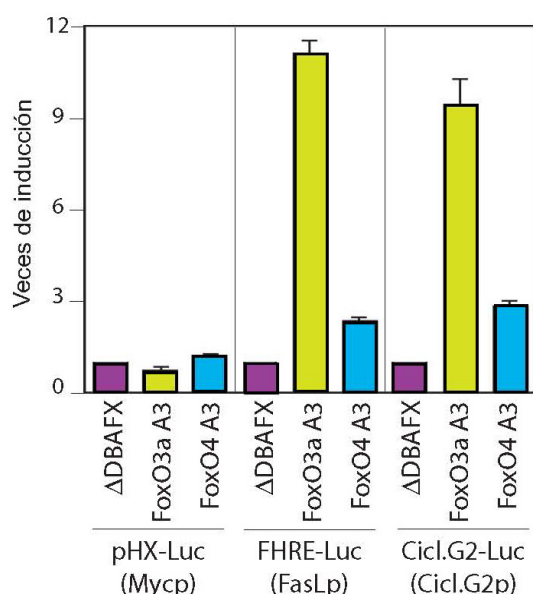


Figura 9. Los factores FoxO transactivan el promotor de *Ccng2*. Células NIH3T3 se transfectaron con los plásmidos reporteros de luciferasa indicados junto con plásmidos codificadores para HA-FoxO3a-A3 (FoxO3a A3), HA-FoxO4-A3 (FoxO4 A3) o HA- Δ DBAFX (Δ DBAFX). La actividad luciferasa fue medida en unidades de luz. La señal de fondo, medida en células cotransfectadas con un plásmido de luciferasa y un plásmido control vacíos fue restada a cada muestra. El eje de las ordenadas representa las veces de inducción de la actividad luciferasa obtenida con cada plásmido reportero cotransfectado con HA-FoxO3a-A3 o HA-FoxO4-A3 relativo a la actividad luciferasa del plásmido reportero cotransfectado con FoxO inactivo (HA- Δ DBAFX). En esta figura se muestra la media \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Mycp, promotor de *C-MYC*, FasLp, promotor del ligando de Fas, CycG2p, promotor de *Ccng2*.

II. C-MYC

1. DESCUBRIMIENTO DE UN FACTOR QUE SE UNE AL PROMOTOR DEL GEN *C-MYC*

1.1. El elemento E2F del promotor de *C-MYC* une un factor que no interacciona con el elemento E2F de otros promotores

En un estudio previo empleando ensayos EMSA en el que se comparaba la unión de factores nucleares al elemento E2F de varios promotores, incluido el de *C-MYC*, se observó la aparición de 4 complejos retardados que se denominaron complejos I, II, III y IV (*Campanero et al., 1999*). Al utilizar como sonda el oligonucleótido que contenía el sitio de unión de E2F del promotor de *C-MYC* (E2Fmyc), la banda correspondiente al complejo III aparecía mucho más intensa que con el resto de las sondas empleadas (*Campanero et al., 1999*). Como se ha mencionado previamente, *C-MYC* es un gen activado en la transición G0/G1 del ciclo celular (*Kelly et al., 1983*), mucho antes de que los factores E2F se liberen del efecto represor de los miembros de la familia RB. Basándonos en estos hechos, estudiamos la posibilidad de que el elemento E2F del promotor de *C-MYC* uniera algún factor diferente de los unidos por otros promotores con sitio E2F, cuya movilidad coincidiera con el complejo III y que permitiera el escape de este promotor del efecto represor de los complejos E2F/familia RB. Para investigar esta hipótesis, se realizaron ensayos EMSA empleando extractos nucleares de células X50-7, una línea celular linfoblastoide humana no transformada, y oligonucleótidos marcados radiactivamente que presentan la secuencia del sitio E2F del promotor de *C-MYC* (sonda E2Fmyc) o del sitio E2F distal del promotor de *E2F1* (sonda E2Fe2f1-d). Bajo las condiciones ensayadas, se detectaron los cuatro complejos proteicos referidos anteriormente (I-IV) con cada una de estas dos sondas (Fig. 10C, carril 1). Se valoró la especificidad de las interacciones proteína/ADN de dichos complejos mediante ensayos de competición con un exceso de oligonucleótidos fríos. Las figuras 10A y 10B muestran respectivamente una representación esquemática de varios promotores con elementos E2F, así como la secuencia de dichos elementos, que fueron empleadas en nuestros ensayos como oligonucleótidos competidores. Observamos que, al utilizar la sonda E2Fmyc, los complejos I, II y IV eran competidos por cada uno de los elementos E2F ensayados, excepto por el elemento E2F mutado del promotor de *DHFR* (E2Fdhr-mut) que es incapaz de asociar proteínas de la familia E2F (Fig. 10C, carriles 2-8). Sin embargo, mientras que el complejo III fue eficientemente competido por un exceso del propio oligonucleótido frío (E2Fmyc) (Fig. 10C, carril 6), apenas fue competido por los elementos E2F silvestres de los promotores de *DHFR*, *C-MYC* y *CDC2* o por ambos elementos E2F (distal y proximal) del promotor de *E2F1* (Fig. 10C, carriles 2, 4, 5, 7 y 8).

Al emplear como sonda el sitio E2F distal del promotor de *E2F1* (sonda E2Fe2f1-d), utilizada como control de la unión de los factores E2F, también se detectaron los complejos I-IV ya mencionados

(Fig. 10D, carril 1). Sin embargo, en este caso se observó que la formación de dichos complejos, incluida la del complejo III, era competida eficientemente por cada uno de los otros elementos E2F silvestres (Fig. 10C, carriles 2-8). Por lo tanto, estos datos indican la presencia de E2F o factores relacionados con E2F en estos complejos.

Estos resultados sugieren que, aunque el sitio E2F del promotor de C-MYC puede formar complejos que contienen E2F y que migran con una movilidad correspondiente al complejo III, además forma un complejo distinto (referido aquí como EMYCS; E2F C-MYC Specific) que es específico del elemento E2F de C-MYC y que también migra en el EMSA en la posición del complejo III.

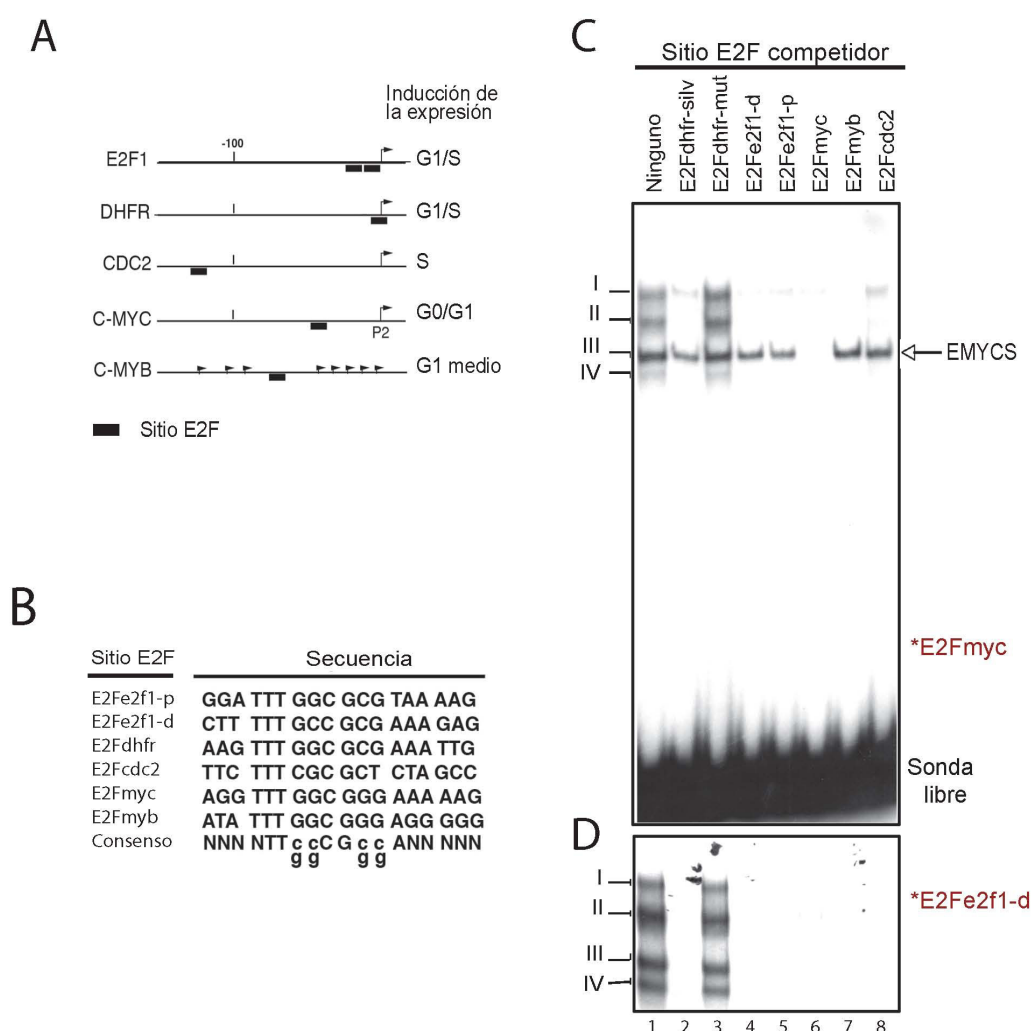


Figura 10. (A) Representación esquemática de varios promotores celulares regulados por E2F. Las flechas indican los sitios de iniciación de la transcripción y las cajas negras representan los elementos E2F. (B) Secuencia de los elementos E2F de los promotores de los genes *E2F1*, *DHFR*, *CDC2*, *C-MYC*, y *C-MYB*. (C-D) Análisis mediante ensayo EMSA de los complejos formados al utilizar extractos nucleares de células X50-7 y los elementos E2F marcados radiactivamente del promotor de *C-MYC* (*E2Fmyc) (A) y del promotor de *E2F1* (*E2Fe2f1-d) (B). Las mezclas de reacción fueron preincubadas en ausencia (Ninguno) o en presencia de un exceso de 100 veces de los

oligonucleótidos competidores fríos indicados. En la figura se indica la posición de los complejos I-IV. E2Fdhfr-silv, E2Fmyc, E2Fmyb y E2Fcdc2 indican respectivamente los oligonucleótidos correspondientes a los sitios E2F de los promotores de los genes *DHFR*, *C-MYC*, *C-MYB* y *CDC2*. Los oligonucleótidos correspondientes a los sitios E2F distal y proximal del promotor *E2F1* son indicados como E2Fe2f1-d y E2Fe2f1-p, respectivamente. E2Fdhfr-mut indica la sonda que presenta una secuencia mutante del sitio E2F de *DHFR*. Se indica la posición de la sonda E2Fmyc libre. La sonda libre no es mostrada en (B) ni en el resto de las figuras de EMSA de esta tesis para no aumentar innecesariamente el tamaño de las figuras.

2. CARACTERIZACIÓN DE EMYCS

2.1. EMYCS no es reconocido por anticuerpos contra las familias de RB y E2F

Para determinar la identidad de los componentes de cada uno de los cuatro complejos detectados, se realizaron a continuación ensayos de competición con anticuerpos. Se ha descrito previamente que DP1 es el componente principal de la gran mayoría de complejos E2F/ADN (*Johnson y Schneider-Broussard, 1998*). También se ha descrito que, al utilizar extractos nucleares de células no transformadas asíncronas, los elementos E2F pueden unir complejos tales como DP1/E2F4/p107 (complejo I), DP1/E2F/RB (complejo II) y uno o más complejos DP1/E2F libres (complejos III y IV) (*Johnson y Schneider-Broussard, 1998; Campanero et al., 1999; Shirodkar et al., 1992*). De acuerdo con estos datos, un anticuerpo anti-DP1 inhibe la formación de varios de estos complejos cuando se utilizan sondas específicas de E2F (*Campanero et al., 1999*).

Empleando extractos nucleares de células X50-7 y las sondas E2Fmyc o E2Fe2f1-d, los complejos I, II y IV fueron afectados por el anticuerpo anti-DP1 empleado (Fig. 11A-11E). Además, los complejos I y II fueron inhibidos en mayor o menor grado por anticuerpos anti-p107 y anti-pRB respectivamente (Fig. 11A y 11C). Observamos también que la formación del complejo IV fue inhibida por el anticuerpo anti-E2F5 y la de los complejos I y II, por el anticuerpo anti-E2F4 (Fig. 11B y 11D). Esto último indicaría que E2F4 podría estar presente en los complejos que contienen pRB y p107.

Todos estos datos sugieren que los complejos I, II y IV formados con la sonda E2Fmyc son similares a aquellos obtenidos con los elementos E2F de otros promotores.

Por el contrario, en estos experimentos, el complejo III presentó nuevamente un comportamiento único cuando se utilizó la sonda E2Fmyc. El anticuerpo anti-E2F4 apenas afectó su formación (Fig. 11B), pero inhibió completamente la aparición de dicho complejo al utilizar la sonda E2Fe2f1-d (Fig. 11D) u otras sondas como E2Fdhfr, E2Fmyb (*Campanero et al., 1999*) o E2Fe2f1-p (*Molina-Privado et al., 2009*). Igual efecto se observó con el anticuerpo anti-DP1 (Fig. 11A-11D). Estas diferencias podrían ser debidas a la presencia del complejo EMYCS que migra en la misma posición que el complejo III.

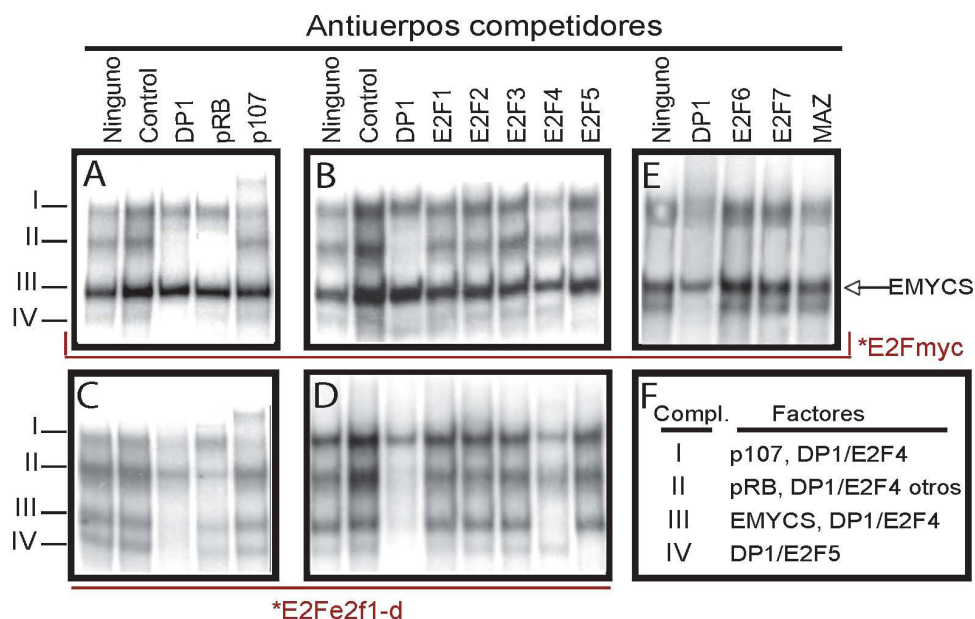


Figura 11. Identificación de miembros de las familias E2F o RB en los complejos ADN/proteína formados con las sondas E2Fmyc y E2Fe2f1-d. (A-D) Las reacciones de unión se llevaron a cabo utilizando extractos nucleares de células X50-7 y las sondas E2Fmyc (A y B) o E2Fe2f1-d (C y D). Las mezclas de reacción se preincubaron en ausencia (Ninguno) o en presencia de anticuerpos contra las proteínas indicadas durante 20 minutos, antes de la adición de la sonda. Como control se utilizó un anticuerpo policlonal preinmune anti-DP1 de ratón. Se indica la posición de los complejos I-IV. (E) Para la mezcla de reacción se utilizaron extractos nucleares de células Saos-2 y la sonda E2Fmyc. Anti-E2F7 es un anticuerpo que reconoce las dos isoformas descritas de E2F7 (E2F7A y E2F7B). El anticuerpo anti-MAZ fue utilizado como control negativo. La flecha indica la posición del complejo que contiene EMYCS. (F) Resumen de los resultados mostrados en los paneles (A-E) detallando la composición de los complejos específicos formados con la sonda E2Fmyc.

Tampoco los anticuerpos anti E2F-1, -2, -3, -6 y -7 afectaron de manera significativa la formación de los complejos I-IV al utilizar cualquiera de ambas sondas (E2Fmyc o E2Fe2f1-d) (Fig 11B, 11D y 11E). Para demostrar que este resultado negativo no era consecuencia de la incapacidad de estos anticuerpos para funcionar en ensayos EMSA, llevamos a cabo nuevos experimentos incubando estos anticuerpos con extractos nucleares de células transfectadas con E2F-1, -2, -3 (Fig. 12A), E2F-6 (Fig. 12B), E2F-7A (Fig. 12C) o E2F7B (Fig. 12D). Todos los anticuerpos fueron capaces de afectar la migración o impedir la formación de los complejos correspondientes. Por lo tanto, la falta de efecto de estos anticuerpos en nuestros EMSAs es probablemente debida a la baja abundancia relativa de estas proteínas en los extractos nucleares empleados más que a la incapacidad de los anticuerpos utilizados para funcionar en este tipo de ensayos.

En conclusión, debido a que la formación del complejo III utilizando la sonda E2Fmyc apenas fue afectada por otros oligonucleótidos que unen E2F, o bien por anticuerpos anti-DP1 o anti-E2F-4 u otros anticuerpos anti-E2F, es muy probable que, aunque este complejo pueda contener algo de proteínas DP1/E2F4, su mayor componente es un factor distinto de los miembros conocidos de la familia E2F (EMYCS).

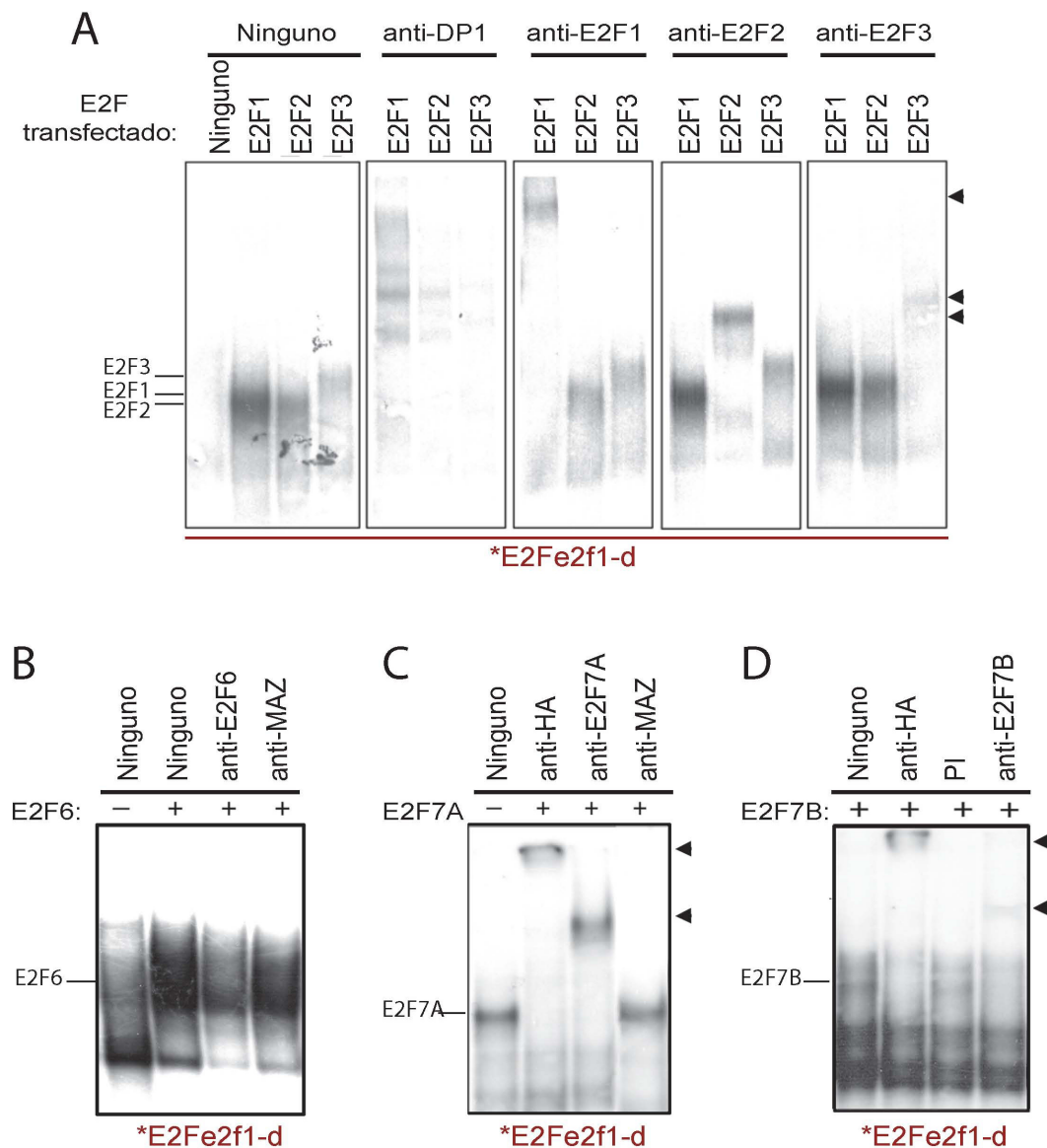


Figura 12. Los anticuerpos anti-E2F1, -E2F2, -E2F3, -E2F6, -E2F7A y -E2F7B funcionan correctamente en ensayos EMSA. (A-D) Las reacciones de unión se llevaron a cabo utilizando la sonda E2Fe2f1-d y extractos nucleares de células Saos-2 transfectadas con DP1 más las subunidades E2F1, E2F2, E2F3 o E2F6 (A-B) o solamente con E2F7A (C) o E2F7B (D). Los extractos se preincubaron en ausencia (Ninguno), o en presencia de los anticuerpos indicados durante 20 minutos previo a la adición de la sonda. El anticuerpo anti-MAZ y el suero preinmune (PI) fueron utilizados como controles negativos. Se indica la posición de los complejos que contienen E2F. Las cabezas de flecha indican la posición de los complejos cuya movilidad se ha modificado por la unión de los anticuerpos.

2.2. Estimación del peso molecular relativo de los componentes del complejo EMYCS

Debido a que EMYCS se une a la sonda E2Fmyc pero no a otras sondas con elementos E2F estudiadas, pensamos que, uniéndola covalentemente a las proteínas que interactúan con ella empleando luz UV (técnica de UV crosslinking), seríamos capaces de detectar una proteína que pudiera ser un componente constitutivo de los complejos III asociados a la sonda E2Fmyc. Dicha proteína no debería estar presente, por el contrario, en los complejos III formados con otras sondas E2F.

La unión covalente formada entre la sonda E2Fmyc y las proteínas del complejo III procedentes de un extracto nuclear de células de la línea X50-7 revelaron la presencia de una banda de 105 kDa (Fig. 13A) que no fue observada en el complejo III que se forma con el elemento E2F de los promotores del gen *C-MYB* y *DHFR* (Fig. 13B y dato no mostrado). Dicha banda podría representar el componente principal del complejo EMYCS. Esta misma banda fue también observada utilizando la línea celular de linfoma de Burkitt DG75 y el elemento E2Fmyc (Fig. 13C). Varias bandas adicionales fueron observadas en los cuatro complejos al emplear ambas sondas. Estas bandas presentan un peso molecular (45 – 70 kDa) dentro del rango de pesos moleculares de los factores E2F y DP conocidos (Fig. 13A-13C). Además, se observó otra banda de 25 kDa que parecía ser común a todas las sondas empleadas y a todos los complejos estudiados (marcada con una flecha pequeña en las figuras 13A-13C). Esta banda podría corresponder a algún factor no descrito previamente que se una en conjunción con miembros de la familia E2F o a alguna otra proteína que también interactúe con estos elementos.

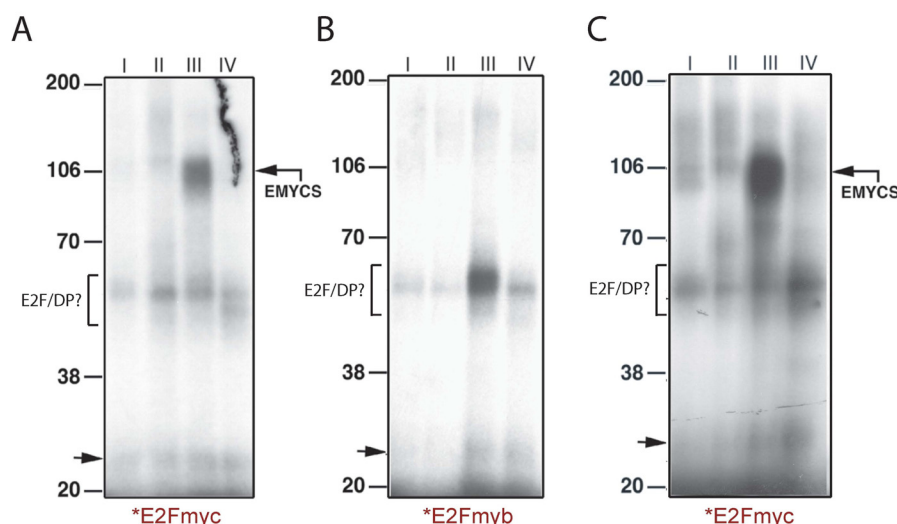


Figura 13. Estimación del peso molecular relativo de los componentes de los complejos de unión al ADN formados con las sondas E2Fmyc y E2Fmyb. (A-C) El análisis mediante entrecruzado por luz UV de los complejos I-IV fue realizado empleando extractos nucleares de células X50-7 y sondas E2Fmyc (A) o E2Fmyb (B) o bien extractos nucleares de células DG75 y la sonda E2Fmyc (C). Las sondas empleadas presentaban BrdU incorporado. Tras la electroforesis en gel nativo, el gel se irradió con luz UV y los complejos I-IV se extrajeron del gel. Las proteínas marcadas presentes en las bandas cortadas se separaron a continuación por electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo SDS. Se muestra en kilodaltons la movilidad de los marcadores de peso molecular

preteñidos tras la compensación de tamaño realizada por el tamaño de la sonda unida a la proteína (11 kDa). Las flechas indican la posición de EMYCS y de la banda de 25 kDa que es común a todos los carriles y a las 2 sondas. El corchete indica la posición de las proteínas con movilidades aparentes similares a los factores E2F y DP.

2.3. El factor EMYCS y los factores E2F se unen al sitio E2F del promotor de *C-MYC* a través de distintas secuencias nucleotídicas

Para continuar con la caracterización de este nuevo complejo, comparamos la especificidad de unión al ADN del factor EMYCS respecto de aquella mostrada por los complejos que contienen E2F. Como se muestra en las figuras 14A y 14B, el análisis de interferencia por metilación empleando como sonda el elemento E2Fmyc, reveló diferencias específicas en los residuos de contacto utilizados por EMYCS (complejo III) para unirse a la hebra directa del ADN respecto de los utilizados por los complejos pRB/E2F o p107/E2F (complejos I y II) o por E2F libre (complejo IV). Específicamente, la metilación del residuo G en posición 8 no afecta la unión de EMYCS pero sí la unión de los complejos que contienen E2F (Fig. 14A). Por el contrario, no se observaron diferencias en el patrón de metilación entre los distintos complejos cuando se empleó la hebra reversa, quizás debido a la escasez de residuos G y A.

Debido a que la metilación del residuo G en posición 8 impide la unión de los factores E2F pero no la de EMYCS, estudiamos si la mutación de este residuo evita la unión de las proteínas E2F sin afectar la unión del factor EMYCS. Para ello diseñamos un oligonucleótido mutante específico para EMYCS (E2Fmyc-sp) mediante la sustitución de G por T en posición 8 (figura 14C). También se generó un oligonucleótido mutante, al que denominamos E2Fmyc-E2F (Fig. 14C) en el cual se modificaron las posiciones 4, 7 y 12 de modo que el núcleo de 12 nucleótidos del sitio E2Fmyc concordara con el del sitio E2Fe2f1-d del promotor de *E2F1*, que une sólo proteínas E2F pero no EMYCS. Por último, se diseñó un oligonucleótido incapaz de interaccionar con ninguno de estos factores (E2Fmyc-nulo) por mutación de las posiciones 9-11 del sitio E2F (Fig. 14C).

A continuación, empleamos estos oligonucleótidos mutados en ensayos EMSA. Como se muestra en la figura 14D, la formación de complejos empleando la sonda E2Fmyc silvestre (E2Fmyc-silv) fue competida con un exceso de este mismo oligonucleótido (silv) pero no con el mutante E2Fmyc nulo (nulo). Es de hacer notar que el oligonucleótido E2Fmyc-sp (sp) impidió la formación del complejo III, pero no afectó la de los complejos I, II y IV. En cambio, el oligonucleótido E2Fmyc-E2F (E2F) inhibió la formación de los complejos I, II y IV, sin afectar la aparición del complejo III.

Cuando E2Fmyc-sp fue utilizado como sonda para valorar la unión de factores nucleares (Fig. 14E), se observó un único complejo que migraba con la movilidad del complejo III. Este complejo es específicamente competido por sí mismo y de forma parcial por E2Fmyc-silv, pero no por E2Fmyc-nulo ni por E2Fmyc-E2F. Más aún, el elemento E2F del promotor de *DHFR* (que solo interacciona con

E2F) no compite la unión de EMYCS a la sonda E2Fmyc-sp (Fig. 14F). La competición completa que ejerce el oligonucleótido E2Fmyc-sp frente a la parcialmente ejercida por E2Fmyc-silv podría deberse a que el primero no une proteínas E2F. Alternativamente, la sustitución en posición 8 podría haber incrementado de manera específica la afinidad de este oligonucleótido por la unión de EMYCS.

Como se esperaba, E2Fmyc-E2F forma los complejos I, II, III y IV (Fig. 14G) y la unión de cada uno de ellos es específicamente competida por E2Fmyc-E2F y E2Fmyc-silv. Sin embargo, E2Fmyc-sp y E2Fmyc-nulo no afectaron la unión de ninguno de los complejos a la sonda E2Fmyc-E2F.

Es interesante destacar que la unión de E2F5 libre (complejo IV) así como la de EMYCS es afectada por la metilación del residuo G de la posición 10, mientras que la unión de la mayoría de las especies E2F encontradas en los complejos pRB (II) y p107 (I) no son afectadas por la metilación de este residuo. Hasta el momento no sabemos si estas variaciones reflejan la diferencia en contenido de distintas subunidades E2F entre los complejos I y II respecto del complejo IV, o si la asociación con los miembros de la familia RB altera la especificidad de unión de las proteínas E2F.

En resumen, el/los factores presentes en EMYCS parecen ser diferentes de cualquier miembro conocido de la familia E2F debido a que los residuos de contacto con el ADN para EMYCS en el promotor de C-MYC solapan pero son diferentes de aquellos requeridos para la unión de las proteínas E2F.

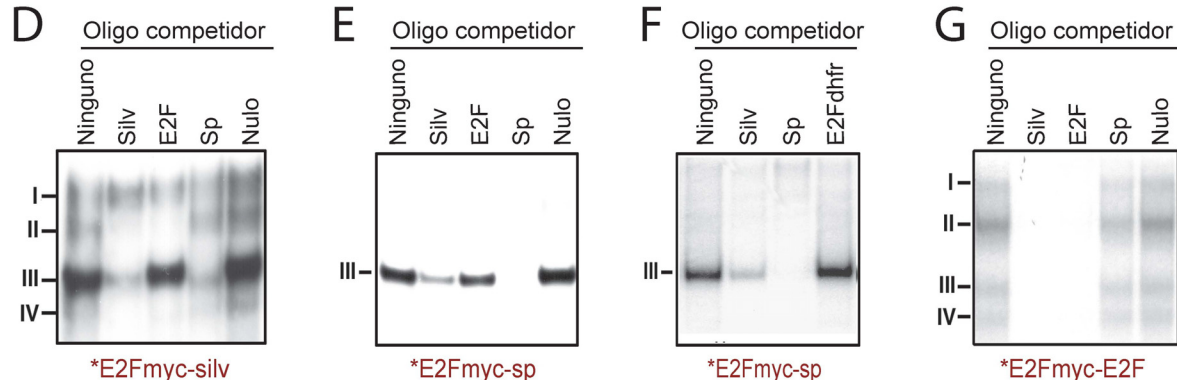


Figura 14. Los factores EMYCS y E2F se unen a secuencias del ADN distintas pero solapantes en el sitio E2F del promotor de *C-MYC*. (A) Análisis de interferencia por metilación de los complejos I-IV empleando extractos nucleares de células X50-7 y la sonda E2Fmyc. A cada lado del gel se indica la secuencia de las cadenas directa y reversa. Triángulos, diamantes y cuadrados indican bases cuya metilación bloquea completa (figuras llenas) o parcialmente (figuras vacías) la formación de complejos I y II (triángulos), III (diamantes) y IV (cuadrados). Se muestra además el patrón de rotura observado con una sonda no unida (F). (B) Resumen del análisis de interferencia por metilación mostrado en A. (C) Secuencia de las sondas E2Fmyc silvestre y mutadas. Los puntos negros indican los nucleótidos mutados respecto de la secuencia silvestre. (D-G) Análisis mediante EMSA de los complejos formados entre los factores nucleares de células X50-7 y las sondas E2Fmyc-silv (D), E2Fmyc-sp (E y F), y E2Fmyc-E2F (G) en ausencia (Ninguno) o en presencia de un exceso de 100 veces de los oligonucleótidos competidores fríos señalados. Se indica la posición de los complejos I-IV.

2.4. El factor EMYCS se expresa de forma ubicua y presenta actividad de unión al ADN constitutiva

Empleando la sonda E2Fmyc-sp observamos que EMYCS se detecta en cantidades significativas en extractos nucleares de todas las líneas celulares estudiadas hasta la fecha, incluyendo 12 líneas

celulares humanas obtenidas de diferentes tejidos y la línea celular de ratón NIH3T3 (Fig. 15). Esto sugiere que EMYCS se expresa de manera ubicua y que su capacidad de interaccionar con el ADN se encuentra constitutivamente activa en todas las líneas celulares estudiadas. Las diferencias en la intensidad de las bandas no parecen ser debidas a diferencias en la abundancia de EMYCS o en su afinidad por la sonda, ya que la abundancia relativa del complejo varía entre experimentos para cada una de las líneas celulares estudiadas.

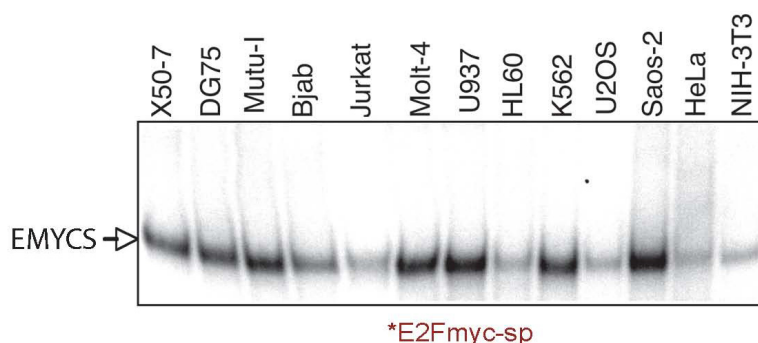


Figura 15. EMYCS es detectado en una amplia variedad de líneas celulares. Análisis mediante EMSA de la formación del complejo III empleando la sonda E2Fmyc-sp y extractos nucleares de las siguientes líneas celulares: línea celular linfoblastoide X50-7, linfoma de Burkitt DG75 y Mutu-1, linfoma de células B Bjab, leucemia de células T Jurkat y Molt-4, células mieloides U937 y HL60, eritromieloides K562, osteosarcoma U2OS y Saos-2, carcinoma de cérvix HeLa y líneas celulares de fibroblastos de ratón NIH3T3. Los extractos nucleares se prepararon a partir de cultivos en crecimiento exponencial. La flecha indica la posición del complejo EMYCS.

3. FUNCIÓN DEL COMPLEJO EMYCS EN LA REGULACIÓN DEL PROMOTOR DE *C-MYC*

3.1. EMYCS actúa como activador transcripcional

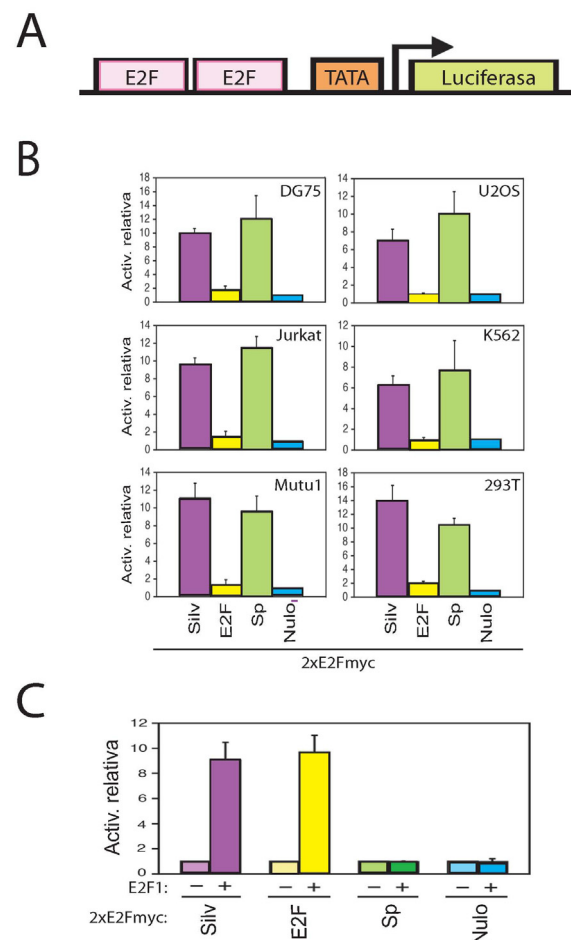
Para valorar el papel que EMYCS juega en la actividad del promotor de *C-MYC* y su capacidad para interaccionar *in vivo* con el elemento E2F de dicho promotor, se generó un plásmido reportero de luciferasa (2xE2Fmyc-BG-LUC) que contenía una caja TATA y dos copias del elemento E2F del promotor de *C-MYC* (véase Fig. 16A y Materiales y Métodos). Además de la secuencia silvestre (silv), también se utilizaron sitios E2F que contenían las mutaciones puntuales indicadas en la figura 14C, creándose así plásmidos reporteros con elementos E2F que interaccionaran sólo con E2F (E2F), sólo con EMYCS (sp) o con ninguno de ellos (nulo). Estos plásmidos reporteros se transfectaron en distintas líneas celulares y la actividad luciferasa de los extractos celulares se midió para valorar la capacidad de transactivación de cada factor. Como se muestra en la figura 16B, el sitio silvestre (silv) y el que solo interacciona con EMYCS (sp), indujeron un aumento en la actividad luciferasa de 6 a 14 veces mayor que el producido por el mutante que no une ninguno de los 2 factores (nulo). Las actividades luciferasa obtenidas cuando se utilizaron los reporteros que sólo une E2F (E2F) o que no une ninguno de los factores (nulo) fueron casi idénticas (Fig. 16B).

Estos resultados sugieren que EMYCS se une in vivo al sitio E2F del promotor de C-MYC, que tiene actividad activadora de la transcripción y que podría actuar como un transactivador del promotor de C-MYC.

Para verificar que la construcción 2xE2Fmyc es activa y que los factores E2F solo se unen *in vivo* a la secuencia silvestre y al mutante que solo interacciona con E2F, pero no a los elementos mutantes nulo o específico de EMYCS (sp), se cotransfectaron los reporteros luciferasa anteriormente mencionados con o sin plásmidos que codifican para E2F1 y DP1. Nuestros resultados claramente indican que E2F1 activó los reporteros 2xE2Fmyc-silv y 2xE2Fmyc-E2F, pero no 2xE2Fmyc-sp o 2xE2Fmyc-nulo (Fig. 16C).

Estos datos confirman que los factores E2F son incapaces de interaccionar in vivo con el sitio E2F que solo une el factor EMYCS (sp).

Figura 16. EMYCS induce la transactivación de un plásmido reportero de luciferasa. (A) Representación esquemática del plásmido reportero utilizado. Dos copias del sitio E2F silvestre (silv) del promotor de *C-MYC* o de los mutantes del mismo que interaccionan sólo con E2F (E2F), solo con EMYCS (sp), o con ninguno de ellos (nulo) se clonaron inmediatamente delante de la caja TATA del gen de la β -globina en el vector pBG-LUC. (B) Los plásmidos 2xE2Fmyc-BG-LUC indicados se cotransfectaron con pCMV- β gal en cultivos asíncronos de células DG75, U2OS, Jurkat, K562, Mutu-1 y 293-T. 40h más tarde, se prepararon los extractos celulares y se realizaron los ensayos de actividad de luciferasa y β -galactosidasa. Los valores de luciferasa se normalizaron respecto de la actividad β -galactosidasa y representan la media de al menos 4 experimentos diferentes. La actividad luciferasa se muestra respecto de aquella del mutante nulo. (C) Los plásmidos 2xE2Fmyc-BG-LUC indicados se cotransfectaron con pCMV- β gal en cultivos asíncronos de células Saos-2 en presencia (+) o ausencia (-) de plásmidos que codifican DP1 y E2F1. 40h después se prepararon los extractos celulares y se realizaron los ensayos luciferasa y β -galactosidasa. Los valores de luciferasa se normalizaron respecto de la actividad β -galactosidasa y representan la media de al menos 4 experimentos diferentes. La actividad luciferasa se muestra respecto de aquella de la muestra en ausencia de DP1+E2F1.



3.2. EMYCS actúa como activador transcripcional de *C-MYC* en linfocitos T durante la salida de quiescencia

La región regulatoria de *C-MYC* contiene secuencias ubicadas a continuación del sitio principal de inicio de la transcripción en el promotor P2, que son responsables de la pausa de la actividad de la ARN polimerasa II (Marcu *et al.*, 1992; Spencer y Groudine, 1991). Además, por delante del promotor P1, existe una secuencia rica en purinas, capaz de formar una estructura G-cuadrupelex que también actúa como represora de la transcripción (Siddiqui-Jain *et al.*, 2002). Para prevenir la interferencia de estas dos regiones en nuestros estudios, se clonó un inserto de ADN del promotor de *C-MYC* que comprendía la secuencia -274 a +66 (relativo al inicio de la transcripción desde el promotor P2) delante del ADNc de la luciferasa. Este inserto incluía los promotores P1 y P2 pero excluía la hebra rica en purinas y las secuencias relacionadas con la pausa de la ARN polimerasa.

Además, la regulación de la expresión de *C-MYC* requiere elementos de control adicionales no identificados, localizados por fuera de las secuencias regulatorias conocidas (Mautner *et al.*, 1996). Debido a que la inserción de elementos potenciadores (enhancers) de los genes de las cadenas pesadas o ligeras de las inmunoglobulinas por detrás de la región codificadora y por delante de los promotores P1 y P2 de *C-MYC* imita la regulación transcripcional endógena de *C-MYC* (Hortnagel *et al.*, 1995; Lavenu *et al.*, 1994), construimos un vector pEnh-E μ -Myc que portaba el enhancer de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (E μ) insertado directamente delante de estos promotores en el vector pGL2-Enhancer. Es importante remarcar que dicho vector contiene el enhancer de SV40 detrás del ADNc del gen luciferasa (Fig. 17A y Materiales y Métodos).

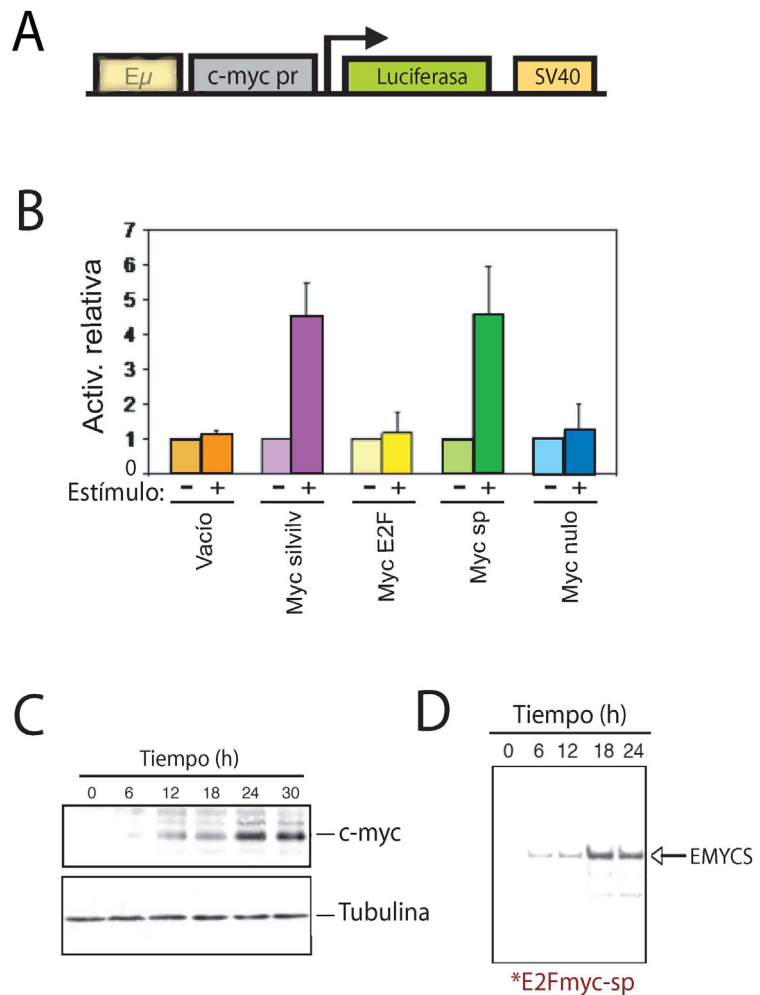
El plásmido pEnh- E μ -Myc silvestre (Myc-silv) y los distintos mutantes cuyos elementos E2F interaccionan solo con E2F (Myc-E2F), solo con EMYCS (Myc-sp) o con ninguno de ellos (Myc-nulo) se transfectaron en células T de sangre periférica ((Fig. 17B). La mayoría de estas células circulan a través de la sangre y órganos linfáticos periféricos en estado quiescente (G0) y no expresan *C-MYC*, pero rápidamente activan la expresión de este gen y salen de quiescencia tras una estimulación mitogénica [Fig. 17C y (Kelly *et al.*, 1983)]. Una vez transfectadas, las células fueron o no estimuladas y la actividad luciferasa fue medida para valorar la respectiva capacidad de transactivación de cada factor. Como se muestra en la figura 17B, los plásmidos reporteros Myc-silv y Myc-sp, fueron activados 4-6 veces tras la activación de las células T. Por el contrario, los plásmidos reporteros Myc-E2F o Myc-nulo, apenas fueron activados. El vector que contenía ambos enhancers, pero ninguna de las secuencias del promotor de *C-MYC* no se activó tras la estimulación de los linfocitos T (Vacío, Fig. 17B). Por ello, solo las construcciones del promotor del gen *C-MYC* que son capaces de interaccionar con EMYCS fueron activadas *in vivo* significativamente durante la salida de quiescencia.

Además, se prepararon extractos nucleares a partir de linfocitos T de sangre periférica estimulados durante diferentes períodos de tiempo. Estos extractos se emplearon en ensayos EMSA para determinar la interacción de los factores presentes en ellos con una sonda E2Fmyc-sp. Como se

muestra en la **figura 17D**, el complejo EMYCS fue casi indetectable en células en estado quiescente, pero su unión aumenta significativamente a partir de las 12 horas de activación de las células, presentando niveles elevados de unión entre las 18-24 horas de la salida de quiescencia. Además, este aumento en la formación de los complejos se correlaciona con el aumento de la expresión de *C-MYC* en los cultivos (**figura 17C**).

Estos resultados apoyan claramente que el elemento E2F del promotor de C-MYC juega un papel crucial en la activación de este gen en células T durante la salida de quiescencia y que la interacción de EMYCS con este elemento es necesaria para conseguir la activación completa del promotor en tales circunstancias.

Figura 17. Activación del promotor de *C-MYC* por EMYCS a través del elemento E2F durante la salida de quiescencia. (A) Representación esquemática del plásmido reportero utilizado (pEnh-E μ -CMYC). Un fragmento de ADN que comprende el enhancer E μ seguido por el inserto que abarca los promotores P1 y P2 de *C-MYC*, excluyendo las secuencias ricas en purinas y las secuencias relacionadas con la pausa, fue clonado en el vector pGL2 que contiene el enhancer de SV40 por detrás del gen de luciferasa. (B) Los plásmidos reporteros de luciferasa pEnh-E μ -Myc-silv, -Myc-E2F, -Myc-sp o -Myc-nulo se cotransfectaron con pRL-SV40 (plásmido de expresión de luciferasa Renilla) en linfocitos de sangre periférica. También se empleó un plásmido reportero que contenía ambos enhancers pero no el promotor de *C-MYC* (Vacío). Una vez transfectadas, las células se activaron mediante tratamiento con 5 μ g/ml de leucoaglutinina más 50U/ml de IL-2 durante 24h para inducir la salida de quiescencia (+), o bien permanecieron sin tratamiento (-). Se midió la actividad luciferasa Firefly y Renilla en los extractos de ambas muestras. Los valores de luciferasa para cada plásmido reportero indicado están relativizados a las células no tratadas. Se muestra la media \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes. (C) Análisis mediante Inmunoblot de extractos celulares totales preparados a partir de linfocitos de sangre periférica activados durante los tiempos indicados con 5 μ g/ml de leucoaglutinina más 50U/ml de IL-2 para inducir la salida de quiescencia. Se emplearon anticuerpos anti-c-myc (panel superior) o anti-tubulina (panel inferior, control de carga). (D) Análisis mediante EMSA de la formación de complejos empleando la sonda E2Fmyc-sp y extractos nucleares de células T de sangre periférica activadas como en (C) durante los tiempos indicados. La flecha indica la posición de EMYCS.



4. DETERMINACIÓN DE LA IDENTIDAD DE LOS FACTORES QUE COMPONEN EL COMPLEJO EMYCS

4.1. EMYCS no se corresponde con los factores ETS

Hasta la fecha, la identidad de los factores que componen el complejo EMYCS no ha podido ser elucidada. Se había descrito previamente que los factores ETS-1 y ETS-2 recombinantes se unen a un sitio consenso que solapa con el elemento E2F del promotor P2 de *C-MYC* (Roussel *et al.*, 1994). A pesar de que dichos factores tienen un peso molecular mucho más bajo que el estimado para EMYCS, valoramos igualmente esta posibilidad. Para ello se realizaron ensayos EMSA de competición utilizando extractos nucleares de células X50-7 y la sonda E2Fmyc-sp o bien la sonda PEA3 silvestre (PEA3-silv) como control (Fig. 18). Esta última contiene un sitio de unión consenso para ambos factores ETS (Wasylyk *et al.*, 1990) que está mutado en el oligonucleótido PEA3-nulo, de forma que este último es incapaz de unir ETS. Como se puede observar, la unión de EMYCS a su elemento (sonda E2Fmyc-sp) no fue afectada por un exceso del oligonucleótido PEA3-silv (Fig. 18B), pero éste si fue capaz de competir la unión de los factores ETS a su sitio específico (Fig 18A).

Por lo tanto, cualquier unión de ETS-1/2 al elemento E2F del promotor de C-MYC debe ser significativamente menor que el nivel de unión observado para EMYCS o los miembros de la familia E2F.

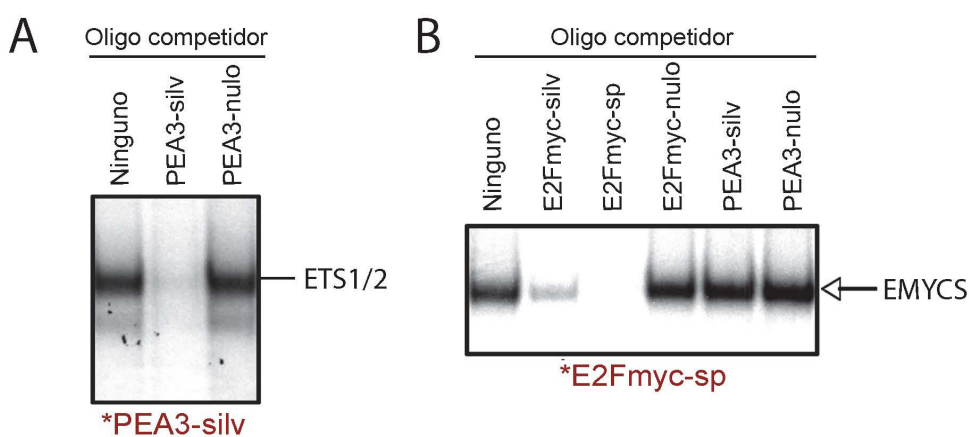
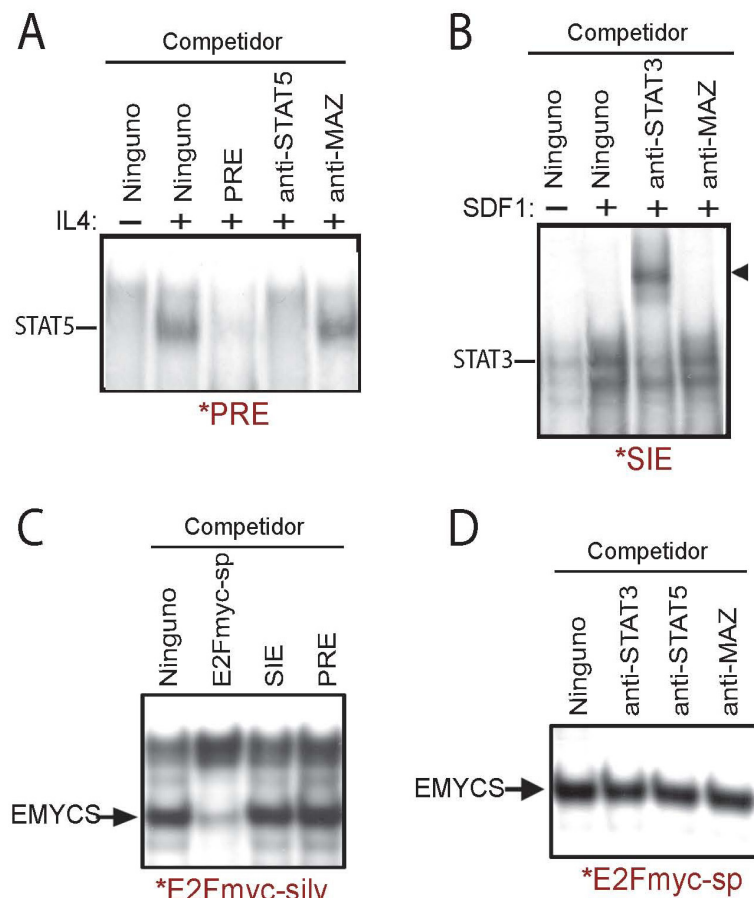


Fig 18. La sonda PEA3 que une ETS-1/2 no impide la unión de EMYCS a la sonda E2Fmyc-sp. Las reacciones de unión se realizaron utilizando extractos nucleares de células X50-7 y las sondas PEA3-silv (A) o E2Fmyc-sp (B). Las mezclas de reacción fueron preincubadas en ausencia (Ninguno) o en presencia de un exceso de 100 veces de los oligonucleótidos competidores fríos indicados en la figura. Se indica la posición de los complejos ETS y EMYCS.

4.2. EMYCS no es un miembro de la familia STAT de factores de transcripción

También se ha descrito previamente que el elemento E2F del promotor P2 de *C-MYC* presenta homología con los sitios de unión al ADN de los factores de transcripción STAT y que el tratamiento de células HepG2 con interleuquina-6 conduce a la unión de STAT3 y activación de *C-MYC* a través de su sitio E2F (Kiuchi *et al.*, 1999). Intentamos, por tanto, determinar si EMYCS podía corresponderse con alguno de los factores de esta familia. Si bien STAT3 o STAT5 están constitutivamente activados en algunas líneas celulares tumorales (Turkson y Jove, 2000), la unión de STAT a su sitio de unión al ADN usualmente requiere la activación de las células por citoquinas o quimioquinas (Buettner *et al.*, 2002). Por ejemplo, la unión de STAT5 a la sonda PRE, requiere de la activación de las células con IL4, mientras que la unión de STAT1 o STAT3 a la sonda SIE, requiere de la activación celular con SDF-1 (*stromal cell derived factor-1*) (Ooi *et al.*, 1998). Los oligonucleótidos PRE y SIE son secuencias previamente descritas en la literatura que unen los factores STAT5 u homodímeros o heterodímeros de STAT1 y STAT3, respectivamente (Ooi *et al.*, 1998). Es importante recordar aquí que, por el contrario, la formación del complejo EMYCS con la sonda E2Fmyc no precisa la activación previa de las células.

Fig 19. EMYCS no contiene factores STAT3 o STAT5. Las reacciones de unión se realizaron utilizando la sonda PRE, que une predominantemente STAT5 y extractos nucleares de células U937 tratadas (+) o no (-) durante 15 minutos con interleuquina-4 (A); la sonda SIE, que interacciona predominantemente con homodímeros o heterodímeros de STAT1 y STAT3, y extractos nucleares de células Molt-4 tratadas durante 15 min con SDF-1 (B); o extractos nucleares de células Saos-2 y la sonda E2Fmyc-silv (C) o E2Fmyc-sp (D). Se indica la posición de los complejos STAT5 (A), STAT3 (B), o EMYCS (C y D). Las mezclas de reacción fueron incubadas en ausencia (Ninguno) o en presencia de un exceso de 100 veces de los oligonucleótidos competidores fríos indicados (A y C) o preincubadas en ausencia (Ninguno) o en presencia de anticuerpos contra las proteínas indicadas durante 20 minutos previo a la adición de las sondas (A, B y D). El anticuerpo anti-Maz fue utilizado como control negativo.



Realizando ensayos EMSA de competición observamos que la unión de EMYCS a su elemento no fue afectada por un exceso de los oligonucleótidos PRE o SIE (Fig 19C) ni por los anticuerpos anti-STAT3 o -STAT5 (Fig 19D) pero que tanto unos como otros eran capaces de abolir la unión de los factores STAT a las sondas correspondientes (Fig 19A y 19B).

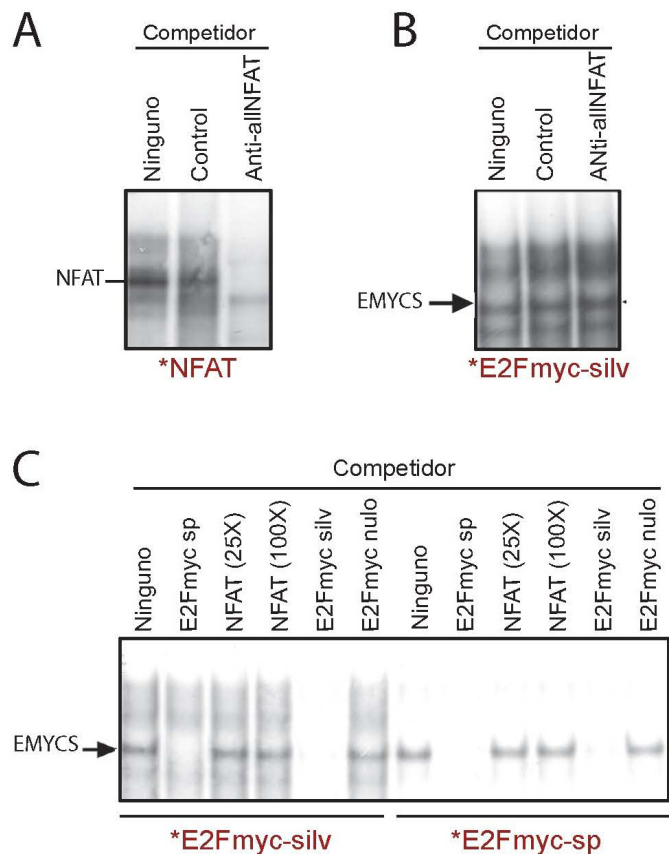
Estos resultados apuntan a que EMYCS no es un miembro conocido de la familia de factores de transcripción STAT.

4.3. EMYCS no pertenece a la familia NFAT

NFATc1 es otro factor que se ha descrito que se une y activa el promotor de *C-MYC* a través de un sitio que solapa con el elemento E2F (Buchholz *et al.*, 2006). Para evaluar si EMYCS es un miembro de la familia NFAT, utilizamos un antisuero dirigido contra un epítipo común del dominio de unión al ADN de todos los miembros NFAT (anticuerpo anti-allNFAT) que inhibe completamente la formación de complejos NFAT en los ensayos EMSA (Iniguez *et al.*, 2000). Este anticuerpo no afecta la unión de EMYCS al elemento E2F del promotor *C-MYC*, pero inhibe la formación de complejos específicos con el sitio NFAT distal del promotor humano de IL-2 (sonda NFAT) (Fig. 20A y 20B). Más aún, el oligonucleótido NFAT no compitió la unión de EMYCS a las sondas E2Fmyc tanto silvestre (E2Fmyc-silv) como específica de EMYCS (E2Fmyc-sp) (Fig. 20C).

Por lo tanto, estos datos sugieren que EMYCS tampoco es un miembro de la familia NFAT.

Fig 20. Los miembros de la familia NFAT no están presentes en el complejo EMYCS. Las reacciones de unión fueron realizadas utilizando extractos nucleares de células X50-7 y las sondas NFAT (A), E2Fmyc-silv (B y C), o E2Fmyc-sp (C). Los extractos se preincubaron 20 minutos previo a la adición de las sondas NFAT (A) o E2Fmyc-silv (B) en ausencia (Ninguno) o en presencia de un anticuerpo que reconoce el dominio de unión al ADN de todos los miembros de la familia NFAT (anti-allNFAT) o bien de un suero preinmune (Control). (C) Las mezclas de reacción se preincubaron en ausencia (Ninguno) o en presencia de un exceso de 100 veces de los oligonucleótidos fríos E2Fmyc sp, E2Fmyc silv o E2Fmyc nulo, o de un exceso de 25 veces (25X) o 100 veces (100X) del oligonucleótido frío NFAT. Se indica la posición de los complejos que contienen NFAT o EMYCS.



4.4. Otras aproximaciones

Asumiendo que EMYCS no se correspondía con ninguna de estas proteínas previamente descritas, intentamos una aproximación diferente para determinar la identidad de este factor. Hemos realizado experimentos de purificación utilizando resinas conjugadas con oligonucleótidos que se unen específicamente al complejo III. Desafortunadamente, EMYCS se une de manera no específica a cualquiera de las resinas ensayadas (agarosa y sefarosa), incluso a aquellas que no tienen oligonucleótido conjugado (datos no mostrados). Por lo tanto, otras aproximaciones experimentales serán necesarias para determinar la identidad de EMYCS.

Discusión

En esta tesis hemos analizado los mecanismos que controlan la expresión de dos genes regulados durante la salida de quiescencia y que son importantes para la progresión del ciclo celular. Por un lado, ciclina G2 es necesaria para el mantenimiento del estado de quiescencia (*Horne et al., 1996; Bennin et al., 2002*) y para la progresión a través de las fases G2 y M del ciclo celular (*Bennin et al., 2002; Arachchige Don et al., 2006*). Por otro lado, la expresión de *C-MYC* se induce durante la salida de quiescencia y la proteína correspondiente es necesaria para la progresión del ciclo celular a través de la fase G1. Nosotros hemos observado que, en células NIH3T3, la expresión de ciclina G2 se induce tanto en G0 como en G2, las 2 fases de máxima actividad de esta ciclina y que su expresión es regulada por los factores de transcripción FoxO. En cuanto a *C-MYC*, hemos detectado, en varias líneas celulares, la existencia de un factor (EMYCS) que podría ser un importante inductor de la expresión de este gen en la salida de G0.

I. CICLINA G2

Ciclina G2 es un miembro de las ciclinas del grupo G cuya expresión oscila a lo largo del ciclo celular en linfocitos (*Horne et al., 1996; 1997*) y cuya expresión ectópica inhibe la progresión del ciclo celular (*Bennin et al., 2002; Liu et al., 2004; Kim et al., 2004; Chen et al., 2006; Le et al., 2007*). En esta tesis examinamos los mecanismos que regulan la expresión de ciclina G2 a lo largo del ciclo celular demostrando la implicación de los factores FoxO en este mecanismo.

1. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE CICLINA G2 A LO LARGO DEL CICLO CELULAR

Como se ha comentado anteriormente, en trabajos previos se ha observado una variación en la expresión del gen *Ccng2* durante el ciclo celular en linfocitos T y B (*Horne et al., 1996; 1997*). Nuestros resultados también muestran una variación cíclica del ARNm de ciclina G2 en células NIH3T3, con niveles máximos en la fase G0, que disminuyen al salir las células de este estado de quiescencia y aumentan nuevamente en la fase S tardía para alcanzar un segundo pico en G2/M. Debido a que la citometría de flujo no permite discriminar entre las fases G2 y M del ciclo (ambas con un contenido 4n de ADN), estudiamos la expresión del gen *Ccng2* en cultivos enriquecidos en células en distintas fases del ciclo celular utilizando distintos métodos. Esta aproximación nos permitió confirmar que el aumento observado en G2/M en células sincronizadas por crecimiento hasta confluencia, se produce en realidad en la fase G2 del ciclo. Sin embargo, el método de enriquecimiento celular mediante drogas muestra niveles significativamente mayores de ARNm de ciclina G2 en la fase G2 del ciclo respecto de la fase G0, en comparación con la técnica de sincronización por confluencia. Esto podría explicarse si observamos que en el primer caso se obtiene un 76% de células en fase G2/M mientras que en el

segundo caso, solo se obtiene un 37%. Igualmente, no se puede descartar un efecto parcial del etopósido sobre la transcripción del ARNm de ciclina G2.

Hemos definido, por tanto, que los niveles máximos de expresión de ciclina G2 en células NIH3T3 se observan en las fases G0 y G2. Estos resultados contrastan con los obtenidos por el grupo de Horne, donde los niveles más elevados han sido encontrados en fase S en linfocitos T y B (*Horne et al., 1996; 1997*). Sin embargo, estas discrepancias podrían ser debidas o bien a diferencias en las células empleadas o bien a la técnica utilizada para obtener células en cada fase del ciclo. El grupo de Horne, utilizó células en crecimiento exponencial que fueron fraccionadas en poblaciones enriquecidas en distintas fases del ciclo celular mediante elutriación. Si bien las fracciones examinadas por este grupo estaban enriquecidas en células en fase S, también contenían células en fase G2/M. De la misma manera, nuestra población de 23h, que es rica en células en la fase G2/M contiene también células en fase S. Sin embargo, en las células sincronizadas en G2 mediante el uso de etopósido, los niveles del ARNm de ciclina G2 se encontraban elevados a pesar de que apenas se detectaron células en la fase S. Por lo tanto, aunque no podamos descartar formalmente que en ambos tipos celulares se esté produciendo el mismo fenómeno y que las diferencias observadas sean inherentes de la técnica empleada, parece más probable que dichas diferencias sean debidas al empleo de distintos tipos celulares.

Respecto del aumento de expresión de ciclina G2 observado en la fase G0, nuestros datos concuerdan con el hecho de que la expresión de esta proteína es inducida por señales inhibitorias del crecimiento (*Horne et al., 1997*), que en nuestros experimentos estarían dadas bien por la inhibición por contacto o bien, por la ausencia de estímulos mitogénicos. Además, se ha visto que la expresión ectópica de ciclina G2 inhibe la transición desde G0/G1 a S (*Bennin et al., 2002; Arachchige Don et al., 2006; Kim et al., 2004; Chen et al., 2006; Le et al., 2007*), por lo que esta ciclina debe estar implicada de alguna manera en el mantenimiento del estado quiescente.

La fase G0 es una fase de quiescencia celular caracterizada por baja tasa de síntesis de proteínas (*Alvarez et al., 2003*) así como por la presencia de altos niveles de proteínas p130 y p27^{kip1}, bajos niveles de ciclina D, inactivación de la ruta PI3K/PKB y la activación o localización nuclear de los factores de transcripción FoxO (*Smith E. J. et al., 1996; MacLachlan et al., 1995; Sherr, 1995; Alvarez et al., 2001; Biggs et al., 1999*). Por el contrario, la estimulación de receptores de membrana por factores de crecimiento induce la entrada en la fase G1 del ciclo celular con la consiguiente activación rápida y transitoria de PI3K/PKB y la inactivación de FoxO (*Alvarez et al., 2001*), seguida por la disminución gradual de p130 (*Smith E. J. et al., 1996*) y p27^{kip1} (*MacLachlan et al., 1995*) y el incremento de las ciclinas de fase G1 (*Hunt, 1991; Sherr, 1995*) y de la síntesis general de proteínas (*Alvarez et al., 2003*). En este estudio, las células quiescentes se obtuvieron o bien por privación de suero o, alternativamente, por crecimiento hasta confluencia. Ambas aproximaciones produjeron células con fenotipo G0, de acuerdo con los criterios que acabamos de describir. Sin embargo, la depleción de suero

fue un método más eficiente para inducir la translocación de FoxO al citoplasma, ya que en más del 90% de las células detenidas por crecimiento hasta confluencia, FoxO3a estaba distribuido entre núcleo y citoplasma (dato no mostrado). No obstante, la doble localización nuclear y citosólica, que se correlaciona con la presencia de factores FoxO activos, ha sido descrita previamente para células en fase G2 (*Alvarez et al., 2001*), por lo que esta doble localización no implica inactivación completa de FoxO.

Por otro lado, en el estudio cinético de células sincronizadas por crecimiento hasta confluencia, observamos un desfase de 5 horas en la entrada en fase S con respecto a las 12-13h reportadas por algunos autores (*Coller, 2007*). Por un lado, esta diferencia podría depender de las células empleadas. Además, se ha descrito que la síntesis de ciclina D depende de la interacción de las células con la matriz extracelular (*Zutter, 2007*), por lo que el retraso observado con esta técnica podría depender directamente del tiempo empleado por las células en adherirse a la placa tras su siembra a menor densidad. No obstante, a pesar de este desfase, una proporción significativa de células progresaron de forma sincronizada a través del ciclo celular. Esto queda demostrado no sólo por el análisis del contenido de ADN, sino también por la expresión de ciclina D3, una ciclina de fase G1 (*Sherr, 1995*), que comenzó a disminuir a partir de las 18h de la liberación, coincidiendo con el aumento de células con contenido de ADN $>2C$. Por lo tanto, estos datos validan el uso de esta aproximación para examinar la expresión de genes durante la progresión del ciclo.

En conclusión, a pesar de la limitación de las técnicas empleadas para detener cultivos celulares en quiescencia, los criterios utilizados para diferenciar las fases G0 y G1 apoyan la expresión de ciclina G2 en la fase G0 del ciclo. Más aún, en células liberadas desde quiescencia, la expresión de ciclina G2 disminuyó en las primeras 1-2h tras el estímulo inductor. Esto indica que la expresión de ciclina G2 disminuye al entrar las células en fase G1, ya que la fase S no comenzó en nuestro sistema hasta las 18-20h tras la adición de suero.

2. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE CICLINA G2

Hemos visto que la activación de la vía de señalización PI3K/PKB en células NIH3T3 regula negativamente la expresión de ciclina G2 durante la entrada en el ciclo celular. Además, hemos confirmado que esta regulación negativa es independiente de la activación de la ruta de MEK1/2 / ERK1/2. Ambas observaciones han sido confirmadas posteriormente en células de cáncer de mama mediante el uso de inhibidores específicos de ambas vías (*Le et al., 2007*). Estos datos son también apoyados por los estudios de Yusuf y col. quienes han descrito que la activación de células B maduras mediada por antígeno induce la activación de la vía PI3K/PKB y la disminución de los niveles de ARNm de ciclina G2 (*Yusuf et al., 2004*). Asimismo, varios autores han observado que el tratamiento

de cultivos con rapamicina también induce el aumento de los niveles de ARNm de ciclina G2 (*Le et al., 2007; Grolleau et al., 2002*). Teniendo en cuenta que rapamicina inhibe la vía de mTOR/p70S6K de inducción de la síntesis proteica y que dicha vía es activada a través de la ruta de PI3K/PKB (*Alvarez et al., 2003*), estos datos apoyan que PI3K regula de manera negativa la expresión de ciclina G2 y que dicha regulación tiene lugar a través de varios mecanismos.

A pesar de que la ruta PI3K/PKB controla los niveles de transcritos de ciclina G2, como acabamos de ver, la expresión de una forma activa de PI3K (p110-CAAX) en células quiescentes fue insuficiente para disminuir los niveles de ARNm de ciclina G2 hasta los valores observados tras la estimulación con suero. Este efecto incompleto podría ser debido, al menos en parte, a la baja eficiencia de transfección obtenida con estas células (50-60%). Alternativamente, estos datos también podrían sugerir que señales adicionales a las mediadas por PI3K podrían contribuir a dicha disminución durante la entrada en la fase G1 desde quiescencia. Debido a que los factores FoxO también son inactivados por la vía de señalización de Ral (*De Ruiter et al., 2001*), es posible que sea esta ruta u otra diferente, la que contribuya junto con aquella mediada por PI3K a inducir la disminución de la expresión del gen *Ccng2*. En este sentido, los datos aportados por Le y col. muestran que la inhibición de la ruta de JNK también induce un incremento leve de la expresión del gen *Ccng2* en varias líneas celulares de cáncer de mama (*Le et al., 2007*), lo que sugiere que efectivamente la expresión de ciclina G2 puede ser regulada por otras vías de señalización alternativas.

3. IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES FOXO EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLINA G2

Nuestros resultados muestran que los factores FoxO (principalmente FoxO3a), inducen la expresión de ciclina G2. Estos resultados han sido confirmados en estudios realizados posteriormente en linfocitos B maduros donde se ha visto que, al igual que ocurre en células NIH3T3, la expresión de ciclina G2 es regulada positivamente por los factores de transcripción FoxO, a través de su unión al promotor de *Ccng2* y que la actividad de FoxO es negativamente regulada por PKB (*Yusuf et al., 2004; Chen et al., 2006*).

Al igual que ocurre con p110-CAAX, que solo tiene un efecto parcial sobre la disminución de los niveles de ciclina G2 en células quiescentes, el mutante inhibidor de la función de FoxO Δ DBAFX disminuye pero no bloquea la expresión de ciclina G2 en la fase G0. Por una parte, esto podría explicarse teniendo en cuenta que la eficiencia de transfección no es del 100%. Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, los factores FoxO cooperan con otros factores de transcripción y coactivadores en la regulación de la expresión de algunos promotores (*Seoane et al., 2004; Nasrin et al., 2000*). Se ha descrito recientemente que en linfocitos B maduros la expresión de ciclina G2 es inducida

no sólo por las proteínas FoxO, sino también por los factores de transcripción δ EF1 y que la coexpresión de ambos factores tiene un efecto sinérgico sobre la inducción de la transcripción del gen *Ccng2* (Chen *et al.*, 2006). De hecho, se propone que en estas células es δ EF1 el principal regulador del gen *Ccng2* y que FoxO actúa como un coactivador (Chen *et al.*, 2006). Por lo tanto, δ EF1 u otros factores de transcripción y/o coactivadores podrían también contribuir a la regulación de la expresión de ciclina G2 en células NIH3T3. Además, debido a que las células ejecutan diferentes programas genéticos en las distintas fases del ciclo celular (Alvarez *et al.*, 2001), es posible que diferentes factores de transcripción y/o coactivadores, expresados selectivamente en las distintas fases del ciclo, contribuyan a modular la expresión de aquellos genes que son regulados por FoxO.

El análisis del promotor de *Ccng2* murino (Jensen *et al.*, 1999) reveló la presencia de varios motivos similares a los sitios consenso de unión de los factores FoxO (Brunet *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000). La presencia de sitios consenso de unión a FoxO en el promotor del gen *Ccng2* murino ha sido confirmada por el grupo de Chen (Chen *et al.*, 2006). El análisis comparativo de los promotores humano y murino utilizando el programa *Blast 2 Sequence*, reveló la existencia de varias áreas con similitud significativa entre ambos. Una de estas regiones contiene varios sitios consenso de unión a los factores forkhead en el promotor murino, así como en el promotor humano. Los grupos en el promotor murino (AF079877) se encuentran entre las posiciones -1296 a -1266 desde el sitio de iniciación de la transcripción, mientras que en el gen humano, (AF549495), se encuentran entre las posiciones -1470 y -1440. Además, en ambos casos, también se observan 2 sitios adicionales en las 100 bp contiguas a esta región.

Los ensayos de cambio en la movilidad electroforética demostraron que los factores FoxO pueden interaccionar con sus elementos consenso de unión presentes en el promotor de *Ccng2*, aunque no se ha determinado si esta unión es directa o mediada por otras proteínas.

Hemos observado que cuando se utilizan extractos nucleares de células sincronizadas en fases G0 y G2 en ensayos EMSA, las bandas correspondientes a los complejos formados entre FoxO y la sonda FoxO-*Ccng2* son más intensas que aquellas que se forman empleando extractos de células en fase G1. Debido a que para esta técnica se emplean extractos nucleares, nuestros resultados son consistentes con el hecho de que los factores FoxO tienen una localización preferentemente nuclear en las fase G0 y G2 y es en esos momentos cuando activan al promotor de *Ccng2*.

Apoyando los resultados obtenidos con los ensayos EMSA, los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina demostraron que los factores FoxO se unen al promotor endógeno del gen *Ccng2* durante la fase G2 del ciclo celular. Sin embargo, en este caso no podemos descartar la unión de los factores FoxO a secuencias no consenso del promotor de *Ccng2*, tal como se ha sido descrito que ocurre en linfocitos B maduros (Chen *et al.*, 2006).

Por último, nuestros ensayos reporteros han demostrado que los factores FoxO son capaces de transactivar al promotor de *Ccng2*, efecto que ha sido también confirmado posteriormente por el grupo de Chen y col (*Chen et al., 2006*).

4. POSIBLES MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIADA POR CICLINA G2

Nuestras observaciones apoyan la existencia de una regulación de los factores de transcripción FoxO y del gen *Ccng2* a lo largo del ciclo celular. En G0 PI3K está inactiva mientras que los factores FoxO están activos e inducen la expresión de ciclina G2. Este hecho sumado a la inducción de la expresión de p27^{Kip1} (*Medema et al., 2000*) y p130 (*Kops et al., 2002*) y a la represión de los genes de ciclinas D1 y D2 (*Schmidt et al., 2002*) mediada por esta familia de factores de transcripción, contribuye al mantenimiento de la quiescencia. En G1, la vía de señalización PI3K/PKB es activada por mitógenos, lo que lleva a la inactivación de los factores FoxO y a la consiguiente regulación negativa de la expresión de ciclina G2 y de los otros genes mencionados, facilitando así la salida de quiescencia. Finalmente, en la fase G2 del ciclo, la actividad transcripcional de las proteínas FoxO es requerida nuevamente ya que contribuye a regular la expresión de ciclina B y la proteína quinasa similar a Polo (Plk), proteínas esenciales para la ejecución de la mitosis y la salida de ciclo (*Alvarez et al., 2001; Yuan et al., 2008*). Es posible que la regulación positiva de ciclina G2 en estas fases tardías también contribuya a facilitar la salida de mitosis (**Fig. D1**). En relación con esta posible función, Bennin y col. observaron que tanto la expresión ectópica de ciclina G2 como la de las subunidades reguladora (B') o catalítica (C) de PP2A inducen la aparición de núcleos aberrantes (fragmentados o multilobulados) que no se correspondían con apoptosis, sino más bien con una mitosis o citoquinesis alteradas (*Bennin et al., 2002*). Posteriormente Arachchige y col. observaron que ciclina G2 (endógena y ectópica) colocaliza con PP2A en los centrosomas y microtúbulos y que su expresión ectópica induce cambios en la estructura de los mismos y alteraciones secundarias en la mitosis y citoquinesis (*Arachchige Don et al., 2006*). Esto implicaría que ciclina G2 podría regular funciones asociadas a estas estructuras celulares y que podría dirigir a PP2A a los centrosomas, donde se ha visto que esta fosfatasa cumple importantes funciones (*Amara et al., 1993; Cheng et al., 1998; Snaith et al., 1996*). Debido a que la elevación de ciclina G2 en células no transfectadas es normalmente moderada y ocurre de manera transitoria durante la transición S/G2 (*Horne et al., 1996; 1997* y el presente estudio), ciclina G2 podría estar implicada en la regulación de algunos procesos relacionados con el citoesqueleto necesarios para la división celular.

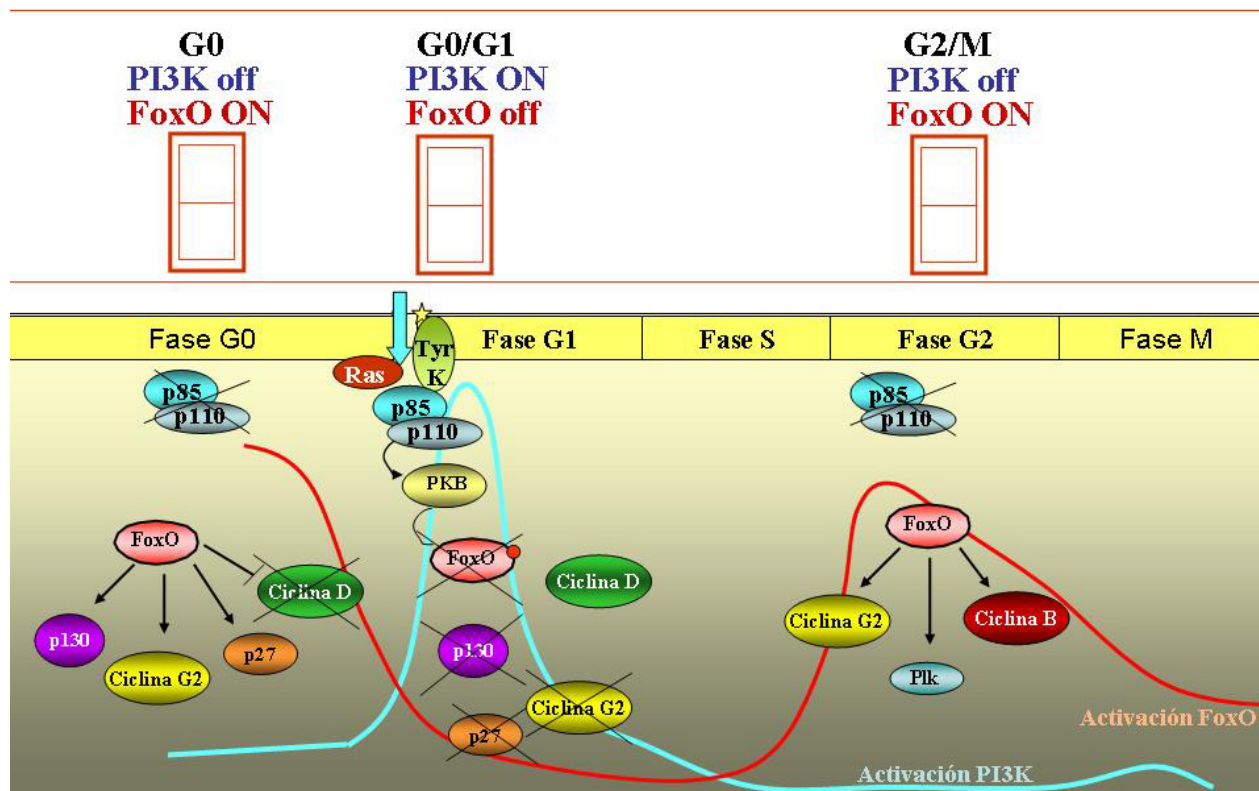


Figura D1. Modelo de la regulación de la actividad de PI3K y de FoxO y de la expresión del gen *Ccng2* a lo largo del ciclo celular. En G0 PI3K permanece inactiva. Los factores FoxO están activos e inducen la expresión de ciclina G2, p130 y p27^{Kip1}, proteínas necesarias para el mantenimiento de la quiescencia, al tiempo que reprimen la expresión de ciclina D. Los estímulos mitogénicos activan PI3K a través de receptores Tyr-quinasa o de Ras. PI3K activa a PKB quien fosforila a FoxO, lo que detiene la transcripción de ciclina G2, p130 y p27^{Kip1} y favorece la expresión de ciclina D. Esto permite la entrada en fase G1. En la fase G2, la vía de PI3K está nuevamente inactiva, mientras que los factores FoxO se activan induciendo la expresión de ciclina B, Plk y ciclina G2, permitiendo de esta manera la correcta consecución de la mitosis. La línea azul muestra el perfil de activación de PI3K a lo largo del ciclo celular, mientras que la línea roja muestra el correspondiente a los factores FoxO.

Como ya se ha mencionado, los factores de transcripción FoxO se encuentran activos en la fase G0 del ciclo donde regulan positivamente la expresión de p27^{Kip1} y p130 (Medema et al., 2000; Kops et al., 2002), dos moléculas que son necesarias para el mantenimiento del estado quiescente. La observación de que las proteínas FoxO inducen la expresión de ciclina G2 en la fase G0, indica un mecanismo adicional por el cual los factores FoxO contribuyen al mantenimiento del estado quiescente. Se ha descrito que tanto la expresión ectópica como endógena de ciclina G2 induce detención del ciclo celular y que ésta ocurre en la fase G1 temprana (Horne et al., 1997; Bennin et al., 2002; Kim et al., 2004; Arachchige Don et al., 2006; Chen et al., 2006; Le et al., 2007). Sin embargo, el mecanismo que media esta inhibición de la proliferación no es del todo conocido. Una hipótesis postula que los complejos ciclina G2/PP2A podrían defosforilar a algún miembro de la familia RB (Alberts et al., 1993; Soprano et al., 2006), impidiendo así la activación de CDK2 y la progresión del ciclo celular (Bennin et al., 2002). Sin embargo, si bien se ha visto que PP2A defosforila p107, la forma de esta

enzima que lleva a cabo dicha función contiene una subunidad reguladora diferente de la que se asocia a ciclina G2 (*Voorhoeve et al., 1999; Bennin et al., 2002*). No obstante, dado que la interacción de ciclina G2 con PP2A podría modificar la especificidad de sustrato de esta última, este sería un posible mecanismo de acción de ciclina G2. Además, se ha visto que la expresión ectópica de ciclina G2 induce una disminución de la actividad de CDK2 (*Bennin et al., 2002; Le et al., 2007*). Por lo tanto, los complejos ciclina G2/PP2A parece que inactivan a CDK2, ya sea de manera directa o indirecta. En definitiva, aunque el mecanismo por el que ciclina G2 induce detención del ciclo celular y mantiene el estado de quiescencia aún permanece desconocido, parece claro que esta ciclina es necesaria para tales funciones, ya que su disminución o su falta completa de expresión favorecen la proliferación y la transformación en varios tipos de tumores (*Ito et al., 2003; Kim et al., 2004*).

II. C-MYC

A pesar de la función crítica que desempeña *C-MYC* durante el desarrollo normal de los tejidos y el efecto de su expresión desregulada en tumores, los mecanismos que gobiernan su expresión no han sido aún completamente descifrados. Durante el desarrollo de esta tesis hemos descubierto un factor nuclear (EMYCS) que interacciona con una secuencia que solapa con el elemento E2F del promotor de *C-MYC*. Este hecho no es de extrañar si tenemos en cuenta que dicho elemento solapa con los sitios de unión para otros factores de transcripción como ETS-1/2, STAT3, NFATc1, KLF11, METS y SMAD (*Wierstra y Alves, 2008*). Si bien EMYCS interacciona con algunos nucleótidos necesarios para la unión de E2F, nuestros datos indican que esta proteína es diferente de los factores E2F conocidos. En primer lugar, hemos observado que el nucleótido G en posición 8 es necesario para la unión de E2F pero no para la de EMYCS, lo que indicaría que las secuencias reconocidas por ambos factores son distintas. Más aún, el tamaño molecular estimado de EMYCS (105 kDa) es diferente del de la mayoría de los miembros de la familia E2F, si bien es similar al de E2F7 (alrededor de 100 kDa). A pesar de ello, ni los anticuerpos anti-E2F7 ni anticuerpos contra otros miembros de las familias de DP o E2F afectaron la formación del complejo EMYCS. Además, E2F7 es un represor transcripcional (*de Bruin et al., 2003; Di Stefano et al., 2003*) mientras que EMYCS activa la transcripción, como hemos demostrado. Por último, mientras que la mayoría de los miembros de la familia E2F interaccionan *in vitro* con los elementos E2F de los promotores de los genes *C-MYC*, *DHFR*, y *E2F1* (*Campanero et al., 2000*), EMYCS solo se une al sitio E2F del promotor de *C-MYC*.

1. DETERMINACIÓN DE LA IDENTIDAD DE EMYCS

De los 6 factores de transcripción conocidos cuyos sitios de unión al promotor de *C-MYC* solapan con el sitio E2F, solo ETS-1/2, STAT3 y NFATc1 actúan como activadores transcripcionales (Wierstra y Alves, 2008), por lo que EMYCS podría corresponderse con alguno de ellos. Roussel y col. (Roussel et al., 1994) reportaron que ETS-1 y ETS-2 recombinantes se unen a un sitio ETS consenso que solapa con el elemento E2F del promotor P2 de *C-MYC*. Sin embargo, estos autores no demostraron dicha asociación con factores ETS endógenos, sino exclusivamente con proteínas recombinantes purificadas. Además, el alto peso molecular estimado para EMYCS sugiere que este factor no puede ser ETS-1 o ETS-2. Más aún, al emplear los sitios de unión de estos factores como oligonucleótidos competidores en ensayos EMSA, éstos no consiguieron interferir la unión de EMYCS a su sitio específico. Por lo tanto, aunque no puede descartarse que estos factores desempeñen algún papel en la regulación de la expresión de *C-MYC* a través del elemento E2F, parece que su aportación podría ser muy inferior a la de EMYCS o E2F.

De la misma manera, se ha reportado previamente que el elemento E2F del promotor P2 de *C-MYC* presenta homología con los sitios de unión al ADN de los factores STAT y que el tratamiento de células HepG2 con interleuquina-6 induce la unión de STAT3 y la activación de *C-MYC* a través de su sitio E2F (Kiuchi et al., 1999). Sin embargo, la unión de EMYCS a su elemento no fue afectada ni por anticuerpos anti-STAT3 o anti-STAT5 ni por un exceso de dos oligonucleótidos que interaccionan con dichos factores. Más aún, la interacción de STAT con su sitio de unión al ADN usualmente requiere la activación de las células con citoquinas y/o quimioquinas (Buettner et al., 2002). En este sentido, a pesar de que se ha reportado que en la línea celular de linfoma de Burkitt DG75 no se observa activación basal de STAT-3 o STAT-5 (Weber-Nordt et al., 1996), nosotros hemos demostrado que EMYCS está presente en células DG75 y que se une al elemento E2F del promotor P2 de *C-MYC*, incluso en ausencia de cualquier tratamiento celular. Más aún, hemos observado que EMYCS es capaz de activar la transcripción en estas células así como en las líneas celulares U2OS, Mutu-1, Jurkat, y 293-T en ausencia de estimulación. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que EMYCS se expresa de manera constitutiva en estas líneas celulares e interacciona con el ADN sin necesidad de estimulación de las células. Por consiguiente, EMYCS no parece corresponder a ningún miembro conocido de la familia STAT de factores de transcripción.

NFATc1 es otro de los factores activadores de la transcripción que se une y activa el promotor de *C-MYC* a través de un sitio que solapa con el elemento E2F (Buchholz et al., 2006). Observamos que la unión de EMYCS a este elemento no fue afectada ni por un antisuero dirigido contra un epítipo común a todos los miembros de la familia NFAT ni por un exceso de oligonucleótido correspondiente a un sitio de unión al ADN de NFAT. Por lo tanto, estos datos sugieren que EMYCS tampoco es un miembro de la familia NFAT.

Para identificar la o las proteínas presentes en el complejo EMYCS hemos llevado a cabo experimentos de purificación mediante cromatografía de afinidad empleando resinas conjugadas a oligonucleótidos que unen específicamente EMYCS. Desafortunadamente este factor se une de manera no específica a las resinas empleadas, incluso en ausencia de oligonucleótidos conjugados. Por lo tanto, todos nuestros intentos por determinar la identidad de los factores del complejo EMYCS no han dado resultado hasta la fecha. En consecuencia, otras aproximaciones experimentales serán necesarias para determinar la identidad de EMYCS.

2. MECANISMOS DE CONTROL DE LA EXPRESION DE *C-MYC* DURANTE LA SALIDA DE QUIESCENCIA.

Hemos observado que EMYCS es un factor ubicuo que se comporta como activador transcripcional en todas las líneas celulares estudiadas, por lo que podría participar en la activación del promotor de *C-MYC* durante la salida de quiescencia. Varios autores han descrito que E2F expresado de manera ectópica es capaz de activar la transcripción de *C-MYC* (Oswald *et al.*, 1994; Majello *et al.*, 1995). Sin embargo, nuestros datos sugieren que la activación de este gen podría ser independiente de la unión de los factores E2F endógenos a su sitio consenso, ya que éstos no son capaces de activar un gen reportero de luciferasa que está bajo el control del mutante del sitio E2F de *C-MYC* que une específicamente E2F, pero no EMYCS (E2Fmyc-E2F). Ahora bien, sabemos que esta secuencia es funcional, puesto que la expresión ectópica de E2F1 induce la actividad luciferasa cuando el ADNc de esta enzima se halla bajo el control de dicha secuencia mutante. Por otra parte, los factores E2F endógenos no parecen capaces de actuar a través del sitio de unión específico para EMYCS, dado que la expresión forzada de E2F1 no es capaz de estimular la actividad luciferasa a través de este sitio. Por lo tanto, el hecho de que E2F active la transcripción de *C-MYC* en los sistemas previamente descritos por otros autores podría deberse a un efecto mediado por altos niveles de E2F como consecuencia de su expresión ectópica pero no ocurrir en condiciones fisiológicas. En consecuencia, todas estas observaciones nos abren nuevas puertas para entender con más precisión la regulación de la expresión de *C-MYC* en la transición G0/G1.

Como ya se ha mencionado, *C-MYC* no se expresa en células quiescentes, pero los niveles de su ARNm aumentan rápidamente tras la inducción de la proliferación celular (Kelly *et al.*, 1983). Para estudiar la regulación de la expresión de este gen en la transición G0/G1 hemos empleado linfocitos T de sangre periférica. Estas células constituyen un modelo excelente para estudiar la salida de G0 ya que se encuentran presentes en la sangre en estado quiescente (G0), pero su entrada en la fase G1 puede inducirse fácilmente y de forma sincronizada mediante distintos estímulos (Firpo *et al.*, 1994). Nuestros resultados sugieren que, al igual que ocurre en células en crecimiento exponencial, la inducción de la

expresión de *C-MYC* en células T tras la salida de quiescencia es independiente de la interacción de E2F con su sitio de unión en el promotor P2, ya que no hemos detectado aumento de actividad luciferasa al utilizar el mutante del promotor que une específicamente E2F. Por el contrario, en estas circunstancias se produce activación del promotor silvestre y del mutante específico que une E2F pero no E2F. Además, la inducción de la interacción de E2F con su sitio de unión en el ADN coincide temporalmente con la inducción de la expresión de *C-MYC*, por lo que E2F podría ser el factor o, al menos, uno de los factores que inducen la transcripción de *C-MYC* durante la salida de quiescencia.

Debido a que la secuencia de unión al ADN de E2F se superpone con el elemento E2F, la formación del complejo E2F debería de ser mutuamente excluyente con la unión de las proteínas E2F al promotor de *C-MYC*. Se ha descrito en modelo de ratón que tanto en células quiescentes de hígado como en la línea celular C2C12 de mioblastos, el promotor de *C-MYC* es ocupado por complejos E2F4/p130/co-represores. Cuando se activa la proliferación de estas células, los complejos co-represores se separan del promotor de *C-MYC*, mientras que el complejo E2F4/p130 permanece unido al promotor, incluso varias horas después del estímulo inductor (Baek et al., 2003; Rodriguez et al., 2006). Esto podría sugerir que el elemento E2F no participa en la activación del promotor de *C-MYC* ya que la presencia de los complejos E2F4/p130 impediría la unión de factores de transcripción activadores a este sitio. Estas observaciones discreparían con nuestros resultados obtenidos en linfocitos T que sugieren que la activación del promotor de *C-MYC* depende, al menos en parte, del sitio E2F. Una posible explicación de lo que ocurre en hepatocitos o mioblastos de ratón podría ser que la disociación de los co-represores tras la activación celular suprimiera la represión del promotor de *C-MYC* a través del sitio E2F y permitiera su activación en la transición G0/G1 por otros factores de transcripción que interaccionan con elementos que no solapan con dicho sitio. De hecho, en células C2C12, la inactivación de HDAC1 y su disociación de los complejos E2F4/p130 está mediada por β -catenina, una proteína activada por la ruta de Wnt (Baek et al., 2003). β -catenina activa además Pitx2 (Kioussi et al., 2002), otro factor de transcripción que activa el promotor de *C-MYC* por unión a un sitio que no solapa con el elemento E2F (Baek et al., 2003). Por lo tanto, podría ocurrir que, una vez que el promotor de *C-MYC* ha dejado de ser reprimido por HDAC1, su activación en células C2C12 podría depender más de la actividad de Pitx2 que del sitio E2F. En consecuencia, la ocupación del sitio E2F por los complejos E2F4/p130 podría no tener efecto negativo sobre la transcripción de *C-MYC* en esta línea celular.

El grupo de Rodriguez y col. ha descrito además que en hepatocitos de ratón la transcripción del gen *C-MYC* se activa a los 30 minutos de la aplicación del estímulo inductor (Rodriguez et al., 2006). Si bien nosotros no hemos estudiado la expresión de este gen a tiempos tan cortos, la inducción tan temprana de la expresión de *C-MYC* observada por este grupo podría diferir igualmente de lo que ocurre en linfocitos T, ya que este tipo celular presenta una cinética de entrada y transición a través de la fase G1 mucho más lenta que la de otros sistemas celulares, tardando entre 25 y 30 horas en alcanzar

la fase S (Rowell y Wells, 2006). Así, es posible que en células T la activación de la expresión de *C-MYC* se produzca de forma más tardía que en hepatocitos de ratón y tenga lugar a través de un mecanismo diferente, como ya se ha discutido.

3. MODELO DE ACTIVACIÓN DE *C-MYC* EN LA TRANSICIÓN G0/G1

Hasta la fecha se sabe que en células quiescentes, en las que *C-MYC* no se expresa, su promotor estaría reprimido por los complejos E2F/familia RB/co-represores (Albert *et al.*, 2001; Harbour y Dean, 2000; Baek *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2006). La estimulación de estas células con mitógenos induce rápidamente la transcripción de *C-MYC* (Facchini y Penn, 1998; Marcu *et al.*, 1992). En consecuencia, es de esperar que factores de transcripción de respuesta inmediata/temprana activen el promotor de este gen en tales circunstancias. Para que esta inducción tenga lugar, la represión mediada por los complejos E2F/familia RB/co-represores debería cesar en la transición G0/G1. Se ha descrito que los complejos ciclina C/CDK3 fosforilan a la proteína pRB en la transición G0/G1 (Ren y Rollins, 2004), por lo que esta fosforilación podría suprimir al menos parcialmente, la represión del promotor de *C-MYC* durante la salida de quiescencia y favorecer la unión de factores de transcripción activadores. Teóricamente, la unión de factores E2F activadores a su sitio consenso en el promotor P2 de *C-MYC* podría facilitar la activación de este promotor en la transición G0/G1. Sin embargo, aunque estos factores son capaces de estimular la transcripción de *C-MYC* (Oswald *et al.*, 1994; Majello *et al.*, 1995), no parece que sean los inductores principales de este gen en la salida de quiescencia ya que los factores E2F activadores no estimulan la transcripción hasta la transición G1/S, cuando las proteínas de la familia RB han sido inactivadas completamente por hiperfosforilación. Por lo tanto, otros factores distintos de E2F deberían ser los responsables de la activación de *C-MYC* en la transición G0/G1. Nosotros proponemos que este evento estaría regulado, al menos en linfocitos T, por la unión de EMYCS al sitio E2F y la consiguiente exclusión de los complejos represores E2F/familia RB del promotor (Fig. D2). Además, EMYCS podría no solo evitar la represión por los complejos E2F/familia RB por competición, sino que incluso podría estimular la transcripción de *C-MYC*. En concordancia con este modelo, *C-MYB*, otro gen de expresión temprana que presenta un sitio E2F en su promotor, es inducido por un factor que no pertenece a la familia E2F pero que interacciona con un elemento que solapa parcialmente con el sitio de unión para los miembros de esta familia (Campanero *et al.*, 1999). Por lo tanto, parece que la ocupación de sitios E2F por factores que no pertenecen a dicha familia podría ser un mecanismo común para la activación de algunos genes con sitios E2F cuando los miembros de RB aún se encuentran activos. De todas maneras, al igual que lo que ocurriría en hepatocitos o mioblastos de ratón, no se podría descartar igualmente la contribución de factores de transcripción que se unan a sitios distales, por ejemplo AP-1, NFkB o STAT4, los cuales podrían

contribuir a superar la represión mediada por los complejos E2F/RB/co-represores permitiendo así la activación de *C-MYC*.

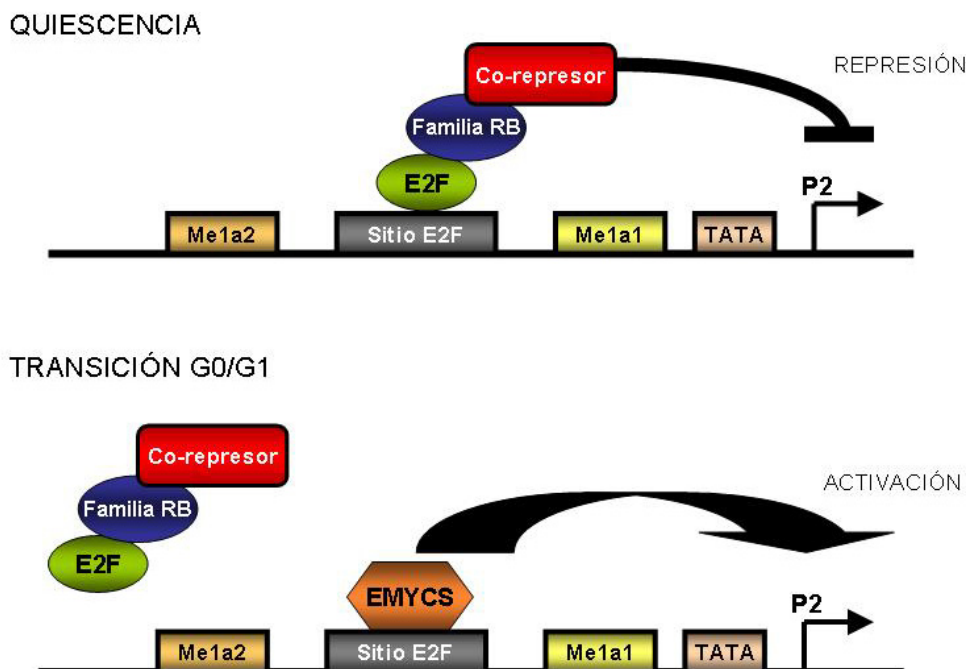


Figura D2. Modelo propuesto para la regulación transcripcional de *C-MYC* por los factores E2F y EMYCS a través del sitio E2F. (A) E2F regula negativamente el promotor de *C-MYC* durante G0 a través de su asociación con miembros de la familia RB y co-represores reclutados. (B) Estímulos que inducen la salida de quiescencia podrían provocar la supresión de la represión del promotor de *C-MYC* por los complejos E2F/familia Rb/co-represores. En concreto, la unión de EMYCS al elemento E2F de dicho promotor podría competir la interacción de los complejos E2F-familia RB-co-represores con el ADN e inducir, además, la activación transcripcional del gen *C-MYC*, sin necesidad de que los miembros de RB se disocien de E2F.

Por último, nuestros hallazgos pueden ser relevantes para el posible papel de la sobreexpresión de *C-MYC* en cáncer. Hemos observado que EMYCS es un factor aparentemente ubicuo que se comporta como activador transcripcional en todas las líneas celulares estudiadas, por lo que podría participar en la activación constitutiva del promotor de *C-MYC* en células tumorales. Ya que EMYCS sería necesario para la activación del gen *C-MYC* durante la salida de quiescencia, es posible que la expresión excesivamente elevada o la expresión de una forma superactiva de este factor pudiera contribuir en algunos casos a la sobreexpresión de *C-MYC* observada en múltiples tumores. Por lo tanto, sería de gran importancia identificar el/los factores presentes en EMYCS para determinar su papel en la expresión de *C-MYC* y en la formación de tumores.

Conclusiones

- 1- La expresión del ARNm de ciclina G2 varía a lo largo del ciclo celular, presentando niveles elevados en las fases G0 y G2 y una marcada reducción de su expresión al entrar las células en la fase G1.
- 2- Los factores de transcripción FoxO inducen la expresión del gen *Ccng2* y son capaces de activar su promotor.
- 3- El promotor del gen *Ccng2* presenta motivos consenso de unión a los factores FoxO que unen FoxO3a tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 4- La regulación negativa de los niveles de ARNm de ciclina G2 en la fase G1 del ciclo celular requiere la activación de la ruta de señalización PI3K/PKB y la consiguiente inactivación de los factores FoxO.
- 5- El elemento E2F del promotor P2 de *C-MYC* une un factor referido en este estudio como EMYCS (E2F C-MYC Specific), que no interacciona con el elemento E2F de otros promotores.
- 6- Los residuos de contacto de EMYCS con el ADN en el promotor de *C-MYC* solapan pero son diferentes de aquellos requeridos para la unión de las proteínas E2F.
- 7- EMYCS no corresponde a ningún factor conocido de la familia E2F, ni a otros factores de transcripción cuyos sitios de unión al ADN solapan con el elemento E2F del promotor P2 de *C-MYC*.
- 8- EMYCS tiene un peso molecular estimado de 105 kDa y se detecta en una amplia variedad de líneas celulares.
- 9- EMYCS tiene capacidad estimuladora de la transcripción y parece necesario para inducir la activación del promotor de *C-MYC* en linfocitos T durante la salida de quiescencia.

Bibliografía

- Adhikary S and Eilers M (2005). **"Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins."** *Nat Rev Mol Cell Biol* **6** (8): 635-645.
- Albert T, Wells J, Funk JO, Pullner A, Raschke EE, Stelzer G, Meisterernst M, Farnham PJ and Eick D (2001). **"The chromatin structure of the dual c-myc promoter P1/P2 is regulated by separate elements."** *J Biol Chem* **276** (23): 20482-20490.
- Alberts AS, Thorburn AM, Shenolikar S, Mumby MC and Feramisco JR (1993). **"Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (2): 388-392.
- Alcami J, Lain de Lera T, Folgueira L, Pedraza MA, Jacque JM, Bachelerie F, Noriega AR, Hay RT, Harrich D, Gaynor RB *et al.* (1995). **"Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes."** *Embo J* **14** (7): 1552-1560.
- Alvarez B, Martinez AC, Burgering BM and Carrera AC (2001). **"Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals."** *Nature* **413** (6857): 744-747.
- Alvarez B, Garrido E, Garcia-Sanz JA and Carrera AC (2003). **"Phosphoinositide 3-kinase activation regulates cell division time by coordinated control of cell mass and cell cycle progression rate."** *J Biol Chem* **278** (29): 26466-26473.
- Amara FM, Chen FY and Wright JA (1993). **"A novel transforming growth factor-beta 1 responsive cytoplasmic trans-acting factor binds selectively to the 3'-untranslated region of mammalian ribonucleotide reductase R2 mRNA: role in message stability."** *Nucleic Acids Res* **21** (20): 4803-4809.
- Aoki M, Jiang H and Vogt PK (2004). **"Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (37): 13613-13617.
- Arachchige Don AS, Dallapiazza RF, Bennin DA, Brake T, Cowan CE and Horne MC (2006). **"Cyclin G2 is a centrosome-associated nucleocytoplasmic shuttling protein that influences microtubule stability and induces a p53-dependent cell cycle arrest."** *Exp Cell Res* **312** (20): 4181-4204.
- Arden KC and Biggs WH, 3rd (2002). **"Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling."** *Arch Biochem Biophys* **403** (2): 292-298.
- Ayer DE and Eisenman RN (1993). **"A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation."** *Genes Dev* **7** (11): 2110-2119.
- Baek SH, Kioussi C, Briata P, Wang D, Nguyen HD, Ohgi KA, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rose DW and Rosenfeld MG (2003). **"Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (6): 3245-3250.
- Baena E, Gandarillas A, Vallespinos M, Zanet J, Bachs O, Redondo C, Fabregat I, Martinez AC and de Alboran IM (2005). **"c-Myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (20): 7286-7291.

- Bates S, Rowan S and Vousden KH (1996). "Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes." *Oncogene* **13** (5): 1103-1109.
- Bennin DA, Don AS, Brake T, McKenzie JL, Rosenbaum H, Ortiz L, DePaoli-Roach AA and Horne MC (2002). "Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest." *J Biol Chem* **277** (30): 27449-27467.
- Bentley DL and Groudine M (1986). "A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells." *Nature* **321** (6071): 702-706.
- Bentley DL and Groudine M (1988). "Sequence requirements for premature termination of transcription in the human c-myc gene." *Cell* **53** (2): 245-256.
- Berberich SJ and Postel EH (1995). "PuF/NM23-H2/NDPK-B transactivates a human c-myc promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element." *Oncogene* **10** (12): 2343-2347.
- Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK and Arden KC (1999). "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (13): 7421-7426.
- Blais A and Dynlacht BD (2004). "Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control." *Curr Opin Genet Dev* **14** (5): 527-532.
- Blais A and Dynlacht BD (2007). "E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control." *Curr Opin Cell Biol* **19** (6): 658-662.
- Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, Hammermann J, Henn T and Lampert F (1997). "Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23)." *Oncogene* **14** (2): 195-202.
- Bouchard C, Marquardt J, Bras A, Medema RH and Eilers M (2004). "Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins." *Embo J* **23** (14): 2830-2840.
- Boyd KE, Wells J, Gutman J, Bartley SM and Farnham PJ (1998). "c-Myc target gene specificity is determined by a post-DNA binding mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (23): 13887-13892.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J and Greenberg ME (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96** (6): 857-868.
- Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA and Greenberg ME (2001). "Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a)." *Mol Cell Biol* **21** (3): 952-965.

- Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM and Ellenrieder V (2006). **"Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway."** *Embo J* **25** (15): 3714-3724.
- Buchkovich K, Duffy LA and Harlow E (1989). **"The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle."** *Cell* **58** (6): 1097-1105.
- Buettner R, Mora LB and Jove R (2002). **"Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention."** *Clin Cancer Res* **8** (4): 945-954.
- Burgering BM and Kops GJ (2002). **"Cell cycle and death control: long live Forkheads."** *Trends Biochem Sci* **27** (7): 352-360.
- Cam H and Dynlacht BD (2003). **"Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication."** *Cancer Cell* **3** (4): 311-316.
- Campanero MR, del Pozo MA, Arroyo AG, Sanchez-Mateos P, Hernandez-Caselles T, Craig A, Pulido R and Sanchez-Madrid F (1993). **"ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway."** *J Cell Biol* **123** (4): 1007-1016.
- Campanero MR and Flemington EK (1997). **"Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (6): 2221-2226.
- Campanero MR, Armstrong M and Flemington E (1999). **"Distinct cellular factors regulate the c-mycb promoter through its E2F element."** *Mol Cell Biol* **19** (12): 8442-8450.
- Campanero MR, Armstrong MI and Flemington EK (2000). **"CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (12): 6481-6486.
- Ceballos E, Delgado MD, Gutierrez P, Richard C, Muller D, Eilers M, Ehinger M, Gullberg U and Leon J (2000). **"c-Myc antagonizes the effect of p53 on apoptosis and p21WAF1 transactivation in K562 leukemia cells."** *Oncogene* **19** (18): 2194-2204.
- Cobrinik D (2005). **"Pocket proteins and cell cycle control."** *Oncogene* **24** (17): 2796-2809.
- Cole MD and Nikiforov MA (2006). **"Transcriptional activation by the Myc oncoprotein."** *Curr Top Microbiol Immunol* **302**: 33-50.
- Coller HA (2007). **"What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation."** *Nat Rev Mol Cell Biol* **8** (8): 667-670.
- Chen J, Yusuf I, Andersen HM and Fruman DA (2006). **"FOXO transcription factors cooperate with delta EF1 to activate growth suppressive genes in B lymphocytes."** *J Immunol* **176** (5): 2711-2721.
- Cheng A, Balczon R, Zuo Z, Koons JS, Walsh AH and Honkanen RE (1998). **"Fostriecin-mediated G2-M-phase growth arrest correlates with abnormal centrosome replication, the formation of**

- aberrant mitotic spindles, and the inhibition of serine/threonine protein phosphatase activity." *Cancer Res* **58** (16): 3611-3619.
- Chung HJ and Levens D (2005). "c-myc expression: keep the noise down!" *Mol Cells* **20** (2): 157-166.
- Dang CV (1999). "c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism." *Mol Cell Biol* **19** (1): 1-11.
- Dang CV, O'Donnell K A and Juopperi T (2005). "The great MYC escape in tumorigenesis." *Cancer Cell* **8** (3): 177-178.
- de Alboran IM, O'Hagan RC, Gartner F, Malynn B, Davidson L, Rickert R, Rajewsky K, DePinho RA and Alt FW (2001). "Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation." *Immunity* **14** (1): 45-55.
- de Alboran IM, Baena E and Martinez AC (2004). "c-Myc-deficient B lymphocytes are resistant to spontaneous and induced cell death." *Cell Death Differ* **11** (1): 61-68.
- de Bruin A, Maiti B, Jakoi L, Timmers C, Buerki R and Leone G (2003). "Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation." *J Biol Chem* **278** (43): 42041-42049.
- De Ruiter ND, Burgering BM and Bos JL (2001). "Regulation of the Forkhead transcription factor AFX by Ral-dependent phosphorylation of threonines 447 and 451." *Mol Cell Biol* **21** (23): 8225-8235.
- del Peso L, Gonzalez VM, Hernandez R, Barr FG and Nunez G (1999). "Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt." *Oncogene* **18** (51): 7328-7333.
- DesJardins E and Hay N (1993). "Repeated CT elements bound by zinc finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoters." *Mol Cell Biol* **13** (9): 5710-5724.
- Di Stefano L, Jensen MR and Helin K (2003). "E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes." *Embo J* **22** (23): 6289-6298.
- Diehl JA, Zindy F and Sherr CJ (1997). "Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway." *Genes Dev* **11** (8): 957-972.
- Dignam JD, Lebovitz RM and Roeder RG (1983). "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei." *Nucleic Acids Res* **11** (5): 1475-1489.
- Dimova DK and Dyson NJ (2005). "The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces." *Oncogene* **24** (17): 2810-2826.

- Dynlacht BD, Flores O, Lees JA and Harlow E (1994). **"Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes."** *Genes Dev* **8** (15): 1772-1786.
- Escobedo JA, Navankasattusas S, Kavanaugh WM, Milfay D, Fried VA and Williams LT (1991). **"cDNA cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF beta-receptor."** *Cell* **65** (1): 75-82.
- Facchini LM, Chen S, Marhin WW, Lear JN and Penn LZ (1997). **"The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter."** *Mol Cell Biol* **17** (1): 100-114.
- Facchini LM and Penn LZ (1998). **"The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights."** *Faseb J* **12** (9): 633-651.
- Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A and Chen J (2001). **"Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling."** *Science* **294** (5548): 1942-1945.
- Firpo EJ, Koff A, Solomon MJ and Roberts JM (1994). **"Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes."** *Mol Cell Biol* **14** (7): 4889-4901.
- Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR and Katzenellenbogen BS (2003). **"Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype."** *Endocrinology* **144** (10): 4562-4574.
- Frech M, Andjelkovic M, Ingley E, Reddy KK, Falck JR and Hemmings BA (1997). **"High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity."** *J Biol Chem* **272** (13): 8474-8481.
- Frolov MV and Dyson NJ (2004). **"Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression."** *J Cell Sci* **117** (Pt 11): 2173-2181.
- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I and Mori N (2000). **"Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues."** *Biochem J* **349** (Pt 2): 629-634.
- Galaktionov K, Chen X and Beach D (1996). **"Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc."** *Nature* **382** (6591): 511-517.
- Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, 3rd, Emanuel BS, Rovera G and Barr FG (1993). **"Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma."** *Nat Genet* **5** (3): 230-235.
- Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R and Eilers M (1995). **"Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2."** *Embo J* **14** (7): 1508-1519.

- Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C and Weinberg RA (1996). **"Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein."** *Oncogene* **12** (6): 1173-1180.
- Grand CL, Powell TJ, Nagle RB, Bearss DJ, Tye D, Gleason-Guzman M and Hurley LH (2004). **"Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (16): 6140-6145.
- Grandori C, Cowley SM, James LP and Eisenman RN (2000). **"The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior."** *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 653-699.
- Greer EL and Brunet A (2005). **"FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression."** *Oncogene* **24** (50): 7410-7425.
- Grolleau A, Bowman J, Pradet-Balade B, Puravs E, Hanash S, Garcia-Sanz JA and Beretta L (2002). **"Global and specific translational control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics."** *J Biol Chem* **277** (25): 22175-22184.
- Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P and Unterman T (1999). **"Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence."** *J Biol Chem* **274** (24): 17184-17192.
- Hann SR, Thompson CB and Eisenman RN (1985). **"c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells."** *Nature* **314** (6009): 366-369.
- Harbour JW and Dean DC (2000). **"The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms."** *Genes Dev* **14** (19): 2393-2409.
- Haslam RJ, Koide HB and Hemmings BA (1993). **"Pleckstrin domain homology."** *Nature* **363** (6427): 309-310.
- Henglein B, Chenivresse X, Wang J, Eick D and Brechot C (1994). **"Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (12): 5490-5494.
- Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM and Nevins JR (1992). **"The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F."** *Genes Dev* **6** (2): 177-185.
- Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF *et al.* (1992). **"Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit."** *Cell* **70** (3): 419-429.
- Horne MC, Goolsby GL, Donaldson KL, Tran D, Neubauer M and Wahl AF (1996). **"Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression."** *J Biol Chem* **271** (11): 6050-6061.

- Horne MC, Donaldson KL, Goolsby GL, Tran D, Mulheisen M, Hell JW and Wahl AF (1997). "**Cyclin G2 is up-regulated during growth inhibition and B cell antigen receptor-mediated cell cycle arrest.**" *J Biol Chem* **272** (19): 12650-12661.
- Hortnagel K, Mautner J, Strobl LJ, Wolf DA, Christoph B, Geltinger C and Polack A (1995). "**The role of immunoglobulin kappa elements in c-myc activation.**" *Oncogene* **10** (7): 1393-1401.
- Hosaka T, Biggs WH, 3rd, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK and Arden KC (2004). "**Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (9): 2975-2980.
- Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM and Tindall DJ (2005). "**Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (5): 1649-1654.
- Huang H and Tindall DJ (2007). "**Dynamic FoxO transcription factors.**" *J Cell Sci* **120** (Pt 15): 2479-2487.
- Hunt T (1991). "**Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality.**" *Semin Cell Biol* **2** (4): 213-222.
- Hunter T (1982). "**Synthetic peptide substrates for a tyrosine protein kinase.**" *J Biol Chem* **257** (9): 4843-4848.
- Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM and Fresno M (2000). "**An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes.**" *J Biol Chem* **275** (31): 23627-23635.
- Iritani BM and Eisenman RN (1999). "**c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (23): 13180-13185.
- Ito Y, Yoshida H, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Kuma K and Miyauchi A (2003). "**Decreased expression of cyclin G2 is significantly linked to the malignant transformation of papillary carcinoma of the thyroid.**" *Anticancer Res* **23** (3B): 2335-2338.
- Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF and Smidt MP (2003). "**FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics.**" *J Biol Chem* **278** (38): 35959-35967.
- Janssens V and Goris J (2001). "**Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling.**" *Biochem J* **353** (Pt 3): 417-439.
- Jensen MR, Factor VM and Thorgeirsson SS (1998). "**Regulation of cyclin G1 during murine hepatic regeneration following Dipin-induced DNA damage.**" *Hepatology* **28** (2): 537-546.
- Jensen MR, Audolfsson T, Keck CL, Zimonjic DB and Thorgeirsson SS (1999). "**Gene structure and chromosomal localization of mouse cyclin G2 (Ccng2).**" *Gene* **230** (2): 171-180.

- Jimenez C, Jones DR, Rodriguez-Viciana P, Gonzalez-Garcia A, Leonardo E, Wennstrom S, von Kobbe C, Toran JL, L RB, Calvo V, Copin SG, Albar JP, Gaspar ML, Diez E, Marcos MA, Downward J, Martinez AC, Merida I and Carrera AC (1998). **"Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase."** *Embo J* 17 (3): 743-753.
- Jimenez C, Portela RA, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Collard J, Serrano A, Martinez AC, Avila J and Carrera AC (2000). **"Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration."** *J Cell Biol* 151 (2): 249-262.
- Johnson DG and Schneider-Broussard R (1998). **"Role of E2F in cell cycle control and cancer."** *Front Biosci* 3: d447-448.
- Jones TR and Cole MD (1987). **"Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences."** *Mol Cell Biol* 7 (12): 4513-4521.
- Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME and Sherr CJ (1993). **"Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4."** *Genes Dev* 7 (3): 331-342.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J and Waterfield MD (2001). **"Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer."** *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 615-675.
- Kelly K, Cochran BH, Stiles CD and Leder P (1983). **"Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor."** *Cell* 35 (3 Pt 2): 603-610.
- Kim Y, Shintani S, Kohno Y, Zhang R and Wong DT (2004). **"Cyclin G2 dysregulation in human oral cancer."** *Cancer Res* 64 (24): 8980-8986.
- Kimura SH, Ikawa M, Ito A, Okabe M and Nojima H (2001). **"Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery."** *Oncogene* 20 (25): 3290-3300.
- Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A and Rosenfeld MG (2002). **"Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development."** *Cell* 111 (5): 673-685.
- Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, Hibi M and Hirano T (1999). **"STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene."** *J Exp Med* 189 (1): 63-73.
- Klippel A, Escobedo JA, Hu Q and Williams LT (1993). **"A region of the 85-kilodalton (kDa) subunit of phosphatidylinositol 3-kinase binds the 110-kDa catalytic subunit in vivo."** *Mol Cell Biol* 13 (9): 5560-5566.

- Klippel A, Escobedo JA, Hirano M and Williams LT (1994). **"The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity."** *Mol Cell Biol* 14 (4): 2675-2685.
- Klippel A, Reinhard C, Kavanaugh WM, Apell G, Escobedo MA and Williams LT (1996). **"Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways."** *Mol Cell Biol* 16 (8): 4117-4127.
- Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D and Williams LT (1997). **"A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain."** *Mol Cell Biol* 17 (1): 338-344.
- Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL and Burgering BM (1999). **"Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B."** *Nature* 398 (6728): 630-634.
- Kops GJ and Burgering BM (2000). **"Forkhead transcription factors are targets of signalling by the proto-oncogene PKB (C-AKT)."** *J Anat* 197 Pt 4: 571-574.
- Kops GJ, Medema RH, Glassford J, Essers MA, Dijkers PF, Coffey PJ, Lam EW and Burgering BM (2002). **"Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors."** *Mol Cell Biol* 22 (7): 2025-2036.
- Krasilnikov MA (2000). **"Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation."** *Biochemistry (Moscow)* 65 (1): 59-67.
- Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG, Jr. and Livingston DM (1994). **"Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase."** *Cell* 78 (1): 161-172.
- Krumm A and Groudine M (1995). **"Tumor suppression and transcription elongation: the dire consequences of changing partners."** *Science* 269 (5229): 1400-1401.
- Lavenu A, Pournin S, Babinet C and Morello D (1994). **"The cis-acting elements known to regulate c-myc expression ex vivo are not sufficient for correct transcription in vivo."** *Oncogene* 9 (2): 527-536.
- Lawlor MA and Alessi DR (2001). **"PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?"** *J Cell Sci* 114 (Pt 16): 2903-2910.
- Le XF, Arachchige-Don AS, Mao W, Horne MC and Bast RC, Jr. (2007). **"Roles of human epidermal growth factor receptor 2, c-jun NH2-terminal kinase, phosphoinositide 3-kinase, and p70 S6 kinase pathways in regulation of cyclin G2 expression in human breast cancer cells."** *Mol Cancer Ther* 6 (11): 2843-2857.
- Lee LA, Resar LM and Dang CV (1995). **"Cell density and paradoxical transcriptional properties of c-Myc and Max in cultured mouse fibroblasts."** *J Clin Invest* 95 (2): 900-904.

- Leone G, Nuckolls F, Ishida S, Adams M, Sears R, Jakoi L, Miron A and Nevins JR (2000). **"Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins."** *Mol Cell Biol* **20** (10): 3626-3632.
- Levens D, Duncan RC, Tomonaga T, Michelotti GA, Collins I, Davis-Smyth T, Zheng T and Michelotti EF (1997). **"DNA conformation, topology, and the regulation of c-myc expression."** *Curr Top Microbiol Immunol* **224**: 33-46.
- Li LH, Nerlov C, Prendergast G, MacGregor D and Ziff EB (1994). **"c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II."** *Embo J* **13** (17): 4070-4079.
- Lindeman GJ, Gaubatz S, Livingston DM and Ginsberg D (1997). **"The subcellular localization of E2F-4 is cell-cycle dependent."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (10): 5095-5100.
- Liu J, Cui ZS, Luo Y, Jiang L, Man XH and Zhang X (2004). **"Effect of cyclin G2 on proliferative ability of SGC-7901 cell."** *World J Gastroenterol* **10** (9): 1357-1360.
- Lock RB and Ross WE (1990). **"Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in Chinese hamster ovary cells."** *Cancer Res* **50** (12): 3761-3766.
- Lolli G and Johnson LN (2005). **"CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs?"** *Cell Cycle* **4** (4): 572-577.
- London L, Keene RG and Landick R (1991). **"Analysis of premature termination in c-myc during transcription by RNA polymerase II in a HeLa nuclear extract."** *Mol Cell Biol* **11** (9): 4599-4615.
- Lundberg AS and Weinberg RA (1998). **"Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes."** *Mol Cell Biol* **18** (2): 753-761.
- Luscher B and Eisenman RN (1990). **"New light on Myc and Myb. Part I. Myc."** *Genes Dev* **4** (12A): 2025-2035.
- Luscher B and Larsson LG (1999). **"The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation."** *Oncogene* **18** (19): 2955-2966.
- MacLachlan TK, Sang N and Giordano A (1995). **"Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer."** *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **5** (2): 127-156.
- Maiti B, Li J, de Bruin A, Gordon F, Timmers C, Opavsky R, Patil K, Tuttle J, Cleghorn W and Leone G (2005). **"Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation."** *J Biol Chem* **280** (18): 18211-18220.
- Majello B, De Luca P, Suske G and Lania L (1995). **"Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins."** *Oncogene* **10** (9): 1841-1848.

- Malumbres M and Barbacid M (2001). **"To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer."** *Nat Rev Cancer* **1** (3): 222-231.
- Malumbres M and Barbacid M (2005). **"Mammalian cyclin-dependent kinases."** *Trends Biochem Sci* **30** (11): 630-641.
- Malumbres M and Barbacid M (2009). **"Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm."** *Nat Rev Cancer* **9** (3): 153-166.
- Marcu KB, Bossone SA and Patel AJ (1992). **"myc function and regulation."** *Annu Rev Biochem* **61**: 809-860.
- Marcu KB, Patel AJ and Yang Y (1997). **"Differential regulation of the c-MYC P1 and P2 promoters in the absence of functional tumor suppressors: implications for mechanisms of deregulated MYC transcription."** *Curr Top Microbiol Immunol* **224**: 47-56.
- Martin RG and Stein S (1976). **"Resting state in normal and simian virus 40 transformed Chinese hamster lung cells."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **73** (5): 1655-1659.
- Matsumura I, Tanaka H and Kanakura Y (2003). **"E2F1 and c-Myc in cell growth and death."** *Cell Cycle* **2** (4): 333-338.
- Mautner J, Behrends U, Hortnagel K, Brielmeier M, Hammerschmidt W, Strobl L, Bornkamm GW and Polack A (1996). **"c-myc expression is activated by the immunoglobulin kappa-enhancers from a distance of at least 30 kb but not by elements located within 50 kb of the unaltered c-myc locus in vivo."** *Oncogene* **12** (6): 1299-1307.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL and Burgering BM (2000). **"AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1."** *Nature* **404** (6779): 782-787.
- Michelotti EF, Tomonaga T, Krutzsch H and Levens D (1995). **"Cellular nucleic acid binding protein regulates the CT element of the human c-myc protooncogene."** *J Biol Chem* **270** (16): 9494-9499.
- Michelotti GA, Michelotti EF, Pullner A, Duncan RC, Eick D and Levens D (1996). **"Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human c-myc gene in vivo."** *Mol Cell Biol* **16** (6): 2656-2669.
- Millward TA, Zolnierowicz S and Hemmings BA (1999). **"Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A."** *Trends Biochem Sci* **24** (5): 186-191.
- Mink S, Mutschler B, Weiskirchen R, Bister K and Klempnauer KH (1996). **"A novel function for Myc: inhibition of C/EBP-dependent gene activation."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (13): 6635-6640.
- Molina-Privado I, Rodriguez-Martinez M, Rebollo P, Martin-Perez D, Artiga MJ, Menarguez J, Flemington EK, Piris MA and Campanero MR (2009). **"E2F1 expression is deregulated and plays an oncogenic role in sporadic Burkitt's lymphoma."** *Cancer Res* **69** (9): 4052-4058.

- Mora A, Komander D, van Aalten DM and Alessi DR (2004). "**PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction.**" *Semin Cell Dev Biol* **15** (2): 161-170.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M and Guarente L (2004). "**Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors.**" *Cell* **116** (4): 551-563.
- Müllner EW and Garcia-Sanz JA (1997). "**Analysis of RNA expression by Northern blotting**", In I. Lefkovits (ed.), Immunology methods manual. Academic Press, London, United Kingdom 1:401-424.
- Nakamura T, Sanokawa R, Sasaki YF, Ayusawa D, Oishi M and Mori N (1995). "**Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain.**" *Exp Cell Res* **221** (2): 534-542.
- Nasrin N, Ogg S, Cahill CM, Biggs W, Nui S, Dore J, Calvo D, Shi Y, Ruvkun G and Alexander-Bridges MC (2000). "**DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (19): 10412-10417.
- Nigg EA (2001). "**Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints.**" *Nat Rev Mol Cell Biol* **2** (1): 21-32.
- Noble ME, Endicott JA, Brown NR and Johnson LN (1997). "**The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control.**" *Trends Biochem Sci* **22** (12): 482-487.
- Nugent JH, Alfa CE, Young T and Hyams JS (1991). "**Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis.**" *J Cell Sci* **99** (Pt 3): 669-674.
- Obaya AJ and Sedivy JM (2002). "**Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells.**" *Cell Mol Life Sci* **59** (1): 126-142.
- Okamoto K and Beach D (1994). "**Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein.**" *Embo J* **13** (20): 4816-4822.
- Okamoto K, Kamibayashi C, Serrano M, Prives C, Mumby MC and Beach D (1996). "**p53-dependent association between cyclin G and the B' subunit of protein phosphatase 2A.**" *Mol Cell Biol* **16** (11): 6593-6602.
- Ooi GT, Hurst KR, Poy MN, Rechler MM and Boisclair YR (1998). "**Binding of STAT5a and STAT5b to a single element resembling a gamma-interferon-activated sequence mediates the growth hormone induction of the mouse acid-labile subunit promoter in liver cells.**" *Mol Endocrinol* **12** (5): 675-687.
- Oswald F, Lovec H, Moroy T and Lipp M (1994). "**E2F-dependent regulation of human MYC: trans-activation by cyclins D1 and A overrides tumour suppressor protein functions.**" *Oncogene* **9** (7): 2029-2036.
- Panayotou G, Bax B, Gout I, Federwisch M, Wroblowski B, Dhand R, Fry MJ, Blundell TL, Wollmer A and Waterfield MD (1992). "**Interaction of the p85 subunit of PI 3-kinase and its N-terminal**

- SH2 domain with a PDGF receptor phosphorylation site: structural features and analysis of conformational changes.** *Embo J* 11 (12): 4261-4272.
- Pardee AB (1974). **"A restriction point for control of normal animal cell proliferation."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (4): 1286-1290.
- Peters JM (1998). **"SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis."** *Curr Opin Cell Biol* 10 (6): 759-768.
- Pfaffl MW (2001). **"A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR."** *Nucleic Acids Res* 29 (9): e45.
- Pines J (1995). **"Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations."** *Adv Cancer Res* 66: 181-212.
- Plas DR and Thompson CB (2003). **"Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome."** *J Biol Chem* 278 (14): 12361-12366.
- Polack A, Strobl L, Feederle R, Schweizer M, Koch E, Eick D, Wiegand H and Bornkamm GW (1991). **"The intron enhancer of the immunoglobulin kappa gene activates c-myc but does not induce the Burkitt-specific promoter shift."** *Oncogene* 6 (11): 2033-2040.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM and Koff A (1994). **"p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest."** *Genes Dev* 8 (1): 9-22.
- Ponzielli R, Katz S, Barsyte-Lovejoy D and Penn LZ (2005). **"Cancer therapeutics: targeting the dark side of Myc."** *Eur J Cancer* 41 (16): 2485-2501.
- Potter M and Marcu KB (1997). **"The c-myc story: where we've been, where we seem to be going."** *Curr Top Microbiol Immunol* 224: 1-17.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L and Sellers WR (2002). **"A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR."** *Cancer Cell* 2 (1): 81-91.
- Ren S and Rollins BJ (2004). **"Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit."** *Cell* 117 (2): 239-251.
- Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG and Cohen P (1999). **"Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B."** *J Biol Chem* 274 (24): 17179-17183.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D and Hall A (1992). **"The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling."** *Cell* 70 (3): 401-410.
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD and Downward J (1994). **"Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras."** *Nature* 370 (6490): 527-532.

- Rodriguez JL, Sandoval J, Serviddio G, Sastre J, Morante M, Perrelli MG, Martinez-Chantar ML, Vina J, Vina JR, Mato JM, Avila MA, Franco L, Lopez-Rodas G and Torres L (2006). **"Id2 leaves the chromatin of the E2F4-p130-controlled c-myc promoter during hepatocyte priming for liver regeneration."** *Biochem J* **398** (3): 431-437.
- Roussel MF, Davis JN, Cleveland JL, Ghysdael J and Hiebert SW (1994). **"Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1."** *Oncogene* **9** (2): 405-415.
- Rowell EA and Wells AD (2006). **"The role of cyclin-dependent kinases in T-cell development, proliferation, and function."** *Crit Rev Immunol* **26** (3): 189-212.
- Roy AL, Carruthers C, Gutjahr T and Roeder RG (1993). **"Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I."** *Nature* **365** (6444): 359-361.
- Sage J, Miller AL, Perez-Mancera PA, Wysocki JM and Jacks T (2003). **"Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry."** *Nature* **424** (6945): 223-228.
- Sanchez I and Dynlacht BD (2005). **"New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control."** *Semin Cell Dev Biol* **16** (3): 311-321.
- Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompmaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM and Medema RH (2002). **"Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D."** *Mol Cell Biol* **22** (22): 7842-7852.
- Sears R, Leone G, DeGregori J and Nevins JR (1999). **"Ras enhances Myc protein stability."** *Mol Cell* **3** (2): 169-179.
- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA and Massague J (2004). **"Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation."** *Cell* **117** (2): 211-223.
- Shapiro DN, Sublett JE, Li B, Downing JR and Naeve CW (1993). **"Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma."** *Cancer Res* **53** (21): 5108-5112.
- Sherr CJ (1994). **"G1 phase progression: cycling on cue."** *Cell* **79** (4): 551-555.
- Sherr CJ (1995). **"D-type cyclins."** *Trends Biochem Sci* **20** (5): 187-190.
- Sherr CJ and Roberts JM (1999). **"CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression."** *Genes Dev* **13** (12): 1501-1512.
- Shilatifard A, Conaway JW and Conaway RC (1997). **"Mechanism and regulation of transcriptional elongation and termination by RNA polymerase II."** *Curr Opin Genet Dev* **7** (2): 199-204.
- Shimizu A, Nishida J, Ueoka Y, Kato K, Hachiya T, Kuriaki Y and Wake N (1998). **"CyclinG contributes to G2/M arrest of cells in response to DNA damage."** *Biochem Biophys Res Commun* **242** (3): 529-533.

- Shirodkar S, Ewen M, DeCaprio JA, Morgan J, Livingston DM and Chittenden T (1992). **"The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner."** *Cell* **68** (1): 157-166.
- Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ and Hurley LH (2002). **"Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (18): 11593-11598.
- Simonsson T, Pribylova M and Vorlickova M (2000). **"A nuclease hypersensitive element in the human c-myc promoter adopts several distinct i-tetraplex structures."** *Biochem Biophys Res Commun* **278** (1): 158-166.
- Smale ST and Baltimore D (1989). **"The "initiator" as a transcription control element."** *Cell* **57** (1): 103-113.
- Smith EJ, Leone G, DeGregori J, Jakoi L and Nevins JR (1996). **"The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state."** *Mol Cell Biol* **16** (12): 6965-6976.
- Smith JA and Martin L (1973). **"Do cells cycle?"** *Proc Natl Acad Sci U S A* **70** (4): 1263-1267.
- Snaith HA, Armstrong CG, Guo Y, Kaiser K and Cohen PT (1996). **"Deficiency of protein phosphatase 2A uncouples the nuclear and centrosome cycles and prevents attachment of microtubules to the kinetochore in Drosophila microtubule star (mts) embryos."** *J Cell Sci* **109** (Pt 13): 3001-3012.
- Soprano KJ, Purev E, Vuocolo S and Soprano DR (2006). **"Rb2/p130 and protein phosphatase 2A: key mediators of ovarian carcinoma cell growth suppression by all-trans retinoic acid."** *Oncogene* **25** (38): 5315-5325.
- Spencer CA and Groudine M (1991). **"Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells."** *Adv Cancer Res* **56**: 1-48.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP and Mak TW (1998). **"Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN."** *Cell* **95** (1): 29-39.
- Stephens LR, Jackson TR and Hawkins PT (1993). **"Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system?"** *Biochim Biophys Acta* **1179** (1): 27-75.
- Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O and Reed SI (2001). **"Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line."** *Nature* **413** (6853): 316-322.
- Sun A, Bagella L, Tutton S, Romano G and Giordano A (2007). **"From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway."** *J Cell Biochem* **102** (6): 1400-1404.

- Surucu B, Bozulic L, Hynx D, Parcellier A and Hemmings BA (2008). **"In vivo analysis of protein kinase B (PKB)/Akt regulation in DNA-PKcs-null mice reveals a role for PKB/Akt in DNA damage response and tumorigenesis."** *J Biol Chem* **283** (44): 30025-30033.
- Takeshita T, Arita T, Higuchi M, Asao H, Endo K, Kuroda H, Tanaka N, Murata K, Ishii N and Sugamura K (1997). **"STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction."** *Immunity* **6** (4): 449-457.
- Tamrakar S, Rubin E and Ludlow JW (2000). **"Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation."** *Front Biosci* **5**: D121-137.
- Tamura K, Kanaoka Y, Jinno S, Nagata A, Ogiso Y, Shimizu K, Hayakawa T, Nojima H and Okayama H (1993). **"Cyclin G: a new mammalian cyclin with homology to fission yeast Cig1."** *Oncogene* **8** (8): 2113-2118.
- Tassan JP, Schultz SJ, Bartek J and Nigg EA (1994). **"Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase)."** *J Cell Biol* **127** (2): 467-478.
- Taub R, Moulding C, Battey J, Murphy W, Vasicek T, Lenoir GM and Leder P (1984). **"Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in burkitt lymphoma cells."** *Cell* **36** (2): 339-348.
- Thomas G (2002). **"The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth."** *Biol Res* **35** (2): 305-313.
- Thompson CB, Challoner PB, Neiman PE and Groudine M (1985). **"Levels of c-myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle."** *Nature* **314** (6009): 363-366.
- Thompson CB, Wang CY, Ho IC, Bohjanen PR, Petryniak B, June CH, Miesfeldt S, Zhang L, Nabel GJ, Karpinski B *et al.* (1992). **"cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1."** *Mol Cell Biol* **12** (3): 1043-1053.
- Tian YL, Liu FR, Liu J, Jiang L, Luo Y and Zhang X (2002). **"[Ectopic expression of cyclin G2 inhibits cell proliferation in HeLa cancer cell line]."** *Ai Zheng* **21** (6): 577-581.
- Tran H, Brunet A, Griffith EC and Greenberg ME (2003). **"The many forks in FOXO's road."** *Sci STKE* **2003** (172): RE5.
- Turkson J and Jove R (2000). **"STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery."** *Oncogene* **19** (56): 6613-6626.
- Tyson JJ and Novak B (2008). **"Temporal organization of the cell cycle."** *Curr Biol* **18** (17): R759-R768.
- Uptain SM, Kane CM and Chamberlin MJ (1997). **"Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation."** *Annu Rev Biochem* **66**: 117-172.

- van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F, Maurice MM and Burgering BM (2006). "**FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP.**" *Nat Cell Biol* **8** (10): 1064-1073.
- Vaque JP, Fernandez-Garcia B, Garcia-Sanz P, Ferrandiz N, Bretones G, Calvo F, Crespo P, Marin MC and Leon J (2008). "**c-Myc inhibits Ras-mediated differentiation of pheochromocytoma cells by blocking c-Jun up-regulation.**" *Mol Cancer Res* **6** (2): 325-339.
- Vervoorts J, Luscher-Firzlauff J and Luscher B (2006). "**The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms.**" *J Biol Chem* **281** (46): 34725-34729.
- Voorhoeve PM, Hijmans EM and Bernards R (1999). "**Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein.**" *Oncogene* **18** (2): 515-524.
- Vorlauffer E and Peters JM (1998). "**Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis.**" *Mol Biol Cell* **9** (7): 1817-1831.
- Wasylyk B, Wasylyk C, Flores P, Begue A, Leprince D and Stehelin D (1990). "**The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation.**" *Nature* **346** (6280): 191-193.
- Weber-Nordt RM, Egen C, Wehinger J, Ludwig W, Gouilleux-Gruart V, Mertelsmann R and Finke J (1996). "**Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines.**" *Blood* **88** (3): 809-816.
- Wierstra I and Alves J (2008). "**The c-myc promoter: still MysterY and challenge.**" *Adv Cancer Res* **99**: 113-333.
- Yang BS, Gilbert JD and Freytag SO (1993). "**Overexpression of Myc suppresses CCAAT transcription factor/nuclear factor 1-dependent promoters in vivo.**" *Mol Cell Biol* **13** (5): 3093-3102.
- Yang J, Song H, Walsh S, Bardes ES and Kornbluth S (2001). "**Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites.**" *J Biol Chem* **276** (5): 3604-3609.
- Yuan Z, Becker EB, Merlo P, Yamada T, DiBacco S, Konishi Y, Schaefer EM and Bonni A (2008). "**Activation of FOXO1 by Cdk1 in cycling cells and postmitotic neurons.**" *Science* **319** (5870): 1665-1668.
- Yusuf I, Zhu X, Kharas MG, Chen J and Fruman DA (2004). "**Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors.**" *Blood* **104** (3): 784-787.
- Zamanian M and La Thangue NB (1993). "**Transcriptional repression by the Rb-related protein p107.**" *Mol Biol Cell* **4** (4): 389-396.

- Zauberman A, Lupo A and Oren M (1995). "Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites." *Oncogene* **10** (12): 2361-2366.
- Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST, Mesecar A, Adam S and Unterman TG (2002). "Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding." *J Biol Chem* **277** (47): 45276-45284.
- Zhu G, Spellman PT, Volpe T, Brown PO, Botstein D, Davis TN and Futcher B (2000). "Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth." *Nature* **406** (6791): 90-94.
- Zutter MM (2007). "Integrin-mediated adhesion: tipping the balance between chemosensitivity and chemoresistance." *Adv Exp Med Biol* **608**: 87-100.
- Zvelebil MJ, MacDougall L, Leever S, Volinia S, Vanhaesebroeck B, Gout I, Panayotou G, Domin J, Stein R, Pages F *et al.* (1996). "Structural and functional diversity of phosphoinositide 3-kinases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **351** (1336): 217-223.

Anexo

El trabajo presentado en esta memoria de Tesis Doctoral se encuentra recogido en los siguientes artículos:

Alvaro-Blanco J, Martínez-Gac L, Calonge E, Rodríguez-Martínez M, Molina-Privado I, Redondo JM, Alcamí J, Flemington EK and Campanero MR (2009). **"A novel factor distinct from E2F mediates C-MYC promoter activation through its E2F element during exit from quiescence"**. *Carcinogenesis* **30** (3): 440-448.

Martinez-Gac L, Álvarez B, Garcia Z, Marques M, Arrizabalaga M, Carrera AC (2004). **"Phosphoinositide 3-Kinase and forkhead, a switch for cell division"**. *Biochem Soc Trans* **32** (Pt2): 360-361.

Martinez-Gac L, Marques M, García Z, Campanero MR and Carrera AC (2004). **"Control of cyclin G2 mRNA expresión by forkhead trancription factors: novel mechanism for cell cycle control by Phosphoinositide 3-kinase and forkhead"**. *Mol Cell Biol* **24** (5): 2181-2189.

A novel factor distinct from E2F mediates *C-MYC* promoter activation through its E2F element during exit from quiescence

Josué Álvaro-Blanco, Lorena Martínez-Gac, Esther Calonge¹, María Rodríguez-Martínez, Irene Molina-Privado, Juan M.Redondo², José Alcami¹, Erik K.Flemington³ and Miguel R.Campanero*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad Autónoma de Madrid; Arturo Duperier, 4; 28029 Madrid, Spain, ¹Unidad de Inmunopatología del Sida; Centro Nacional de Microbiología; Instituto de Salud Carlos III; Carretera de Majadahonda a Pozuelo; Majadahonda; 28220 Madrid, Spain, ²Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares; Melchor Fernandez Almagro, 3; 28029 Madrid, Spain and ³Department of Pathology, Tulane Health Sciences Center, 1430 Tulane Avenue, New Orleans, LA 70112, USA

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 91 585 4490; Fax: +34 91 585 4401; Email: mcampanero@iib.uam.es

Although *C-MYC* is overexpressed in a number of tumors, the mechanisms governing its expression in normal or tumor cells are not completely understood. Recruitment of the Retinoblastoma protein family members to gene promoters by E2F factors has a dominant negative effect on their activity during the G₀ and G₁ phases of the cell cycle. Despite the presence of an E2F-binding site on the *C-MYC* promoter, it escapes the repressive effect of E2F–Retinoblastoma complexes through unknown mechanisms during exit from quiescence. We hypothesized that occupancy of E2F elements by factors distinct from E2F might account for this escape. To test this hypothesis, we investigated whether the E2F element in the *C-MYC* promoter is regulated differently than E2F elements in promoters that are activated at the G₁–S transition. Employing gel shift analysis, the E2F element from the *C-MYC* promoter was found to form a unique non-E2F complex, referred to as E2F *C-MYC* Specific (EMYCS), which is not observed with E2F elements from several other promoters. The DNA contact residues for EMYCS are distinct but overlapping with residues required for binding of E2F proteins. Finally, the approximate estimated molecular weight of the DNA-binding component of EMYCS is 105 kDa. Functional studies indicate that EMYCS has transcriptional transactivation capacity and suggest that it is required to activate the *C-MYC* promoter during exit from quiescence.

Introduction

The *C-MYC* proto-oncogene has been implicated in the development of a large number of human tumors (1). Tumoral transformation by *C-MYC* can take place as a consequence of its overexpression, even in the absence of mutations in its coding region (2). Chromosomal translocations or genomic amplification account for deregulated *C-MYC* expression in a number of tumors (3), but other studies indicate that the increase of *C-MYC* expression in colon and breast carcinomas is rarely due to genomic amplification or translocation (4). These studies are consistent with others showing that deregulated *C-MYC* expression precedes its own amplification and genomic destabilization (5,6). Moreover, it has been proposed that genomic destabilization is one of the mechanisms involved in *C-MYC* induction of many tumors (6,7,8,9,10).

The mechanisms governing *C-MYC* expression are yet poorly understood because regulation of its promoter is extremely complex

with a lot of redundancy, many feedback loops and involvement of several cross-regulatory circuits (11). Its expression is barely detectable in quiescent cells, but it rapidly increases following the initial signaling mediated by stimuli that induce cell proliferation (12). Notably, *C-MYC* induction by growth factors is mediated, at least partly, by its E2F element (13).

The known regulatory elements in the *C-MYC* promoters are not sufficient for *C-MYC* expression after stable transfection (14) or in transgenic mice (15). Proper regulation of *C-MYC* expression requires additional control elements located outside a 50 kb of contiguous DNA sequences covering the human *C-MYC* coding region and ~20 kb of flanking upstream and downstream sequences (16). Insertion of the immunoglobulin k-intron and 3' enhancers downstream from the coding region or insertion of the immunoglobulin heavy chain enhancer E_μ upstream from the P1 and P2 *C-MYC* promoters activates *C-MYC* transcription (15,17).

The E2F family of transcription factors plays a pivotal role in cell cycle regulation of gene expression. E2F factors are generally composed of two structurally related subunits, termed E2F and DP. To date, eight E2F subunits (E2F1 through E2F8) and three DP subunits have been identified in mammalian cells (18). The members of the Retinoblastoma family (pRb, p107 and p130) bind tightly to the C-terminal transactivation domains of E2F1–E2F5, and this interaction probably blocks their association with transcriptional co-activators (19,20). Retinoblastoma family members, through their association with E2Fs, also exert dominant-negative effects on promoter activity, in part through their concomitant interaction with histone deacetylase molecules, histone methylases and nucleosome-modifying protein complexes (21).

The cell proliferation inhibitory properties of pRb family proteins are regulated by phosphorylation (22). In quiescent or differentiated cells, pRb family members are hypophosphorylated and the majority of nuclear E2F factors are bound to pRb family proteins. When cells are stimulated to proliferate, pRb family members become phosphorylated at the G₁–S transition and release free, presumably active E2F (22). As a consequence of these events, most E2F-regulated genes are activated at this stage of the cell cycle. However, although the *C-MYC* gene contains an E2F element, it becomes promptly activated during the exit from quiescence (12) and therefore much earlier than pRb family proteins become phosphorylated and release free E2F. Moreover, *C-MYC* expression remains constitutive throughout the cell cycle in subsequent cycles (23,24). Hence, *C-MYC* is able to largely escape the dominant repressive action of pRb–E2F complexes during the exit from quiescence through unknown mechanisms.

We hypothesized that occupancy of E2F elements by factors distinct from E2F might account for this escape and we uncovered a nuclear factor referred to as EMYCS (from E2F *C-MYC*-Specific complex) that seems to be different from any known E2F family member. Our functional results provide evidence that this factor is a transcriptional activator that may be required to avoid the recruitment of pRb family members to the *C-MYC* E2F site at early phases of G₁ and to elicit *C-MYC* promoter activation during exit from quiescence.

Materials and methods

Cell culture and preparation of nuclear extracts

X50-7, DG75, Mutu-1, Bjab, Jurkat, Molt-4, U937, HL-60 and K562 cells were grown in RPMI 1640 medium, whereas U2OS, Saos-2, HeLa and NIH-3T3 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium. Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, streptomycin and glutamine. All cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂-containing atmosphere. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained as described previously (25). Nuclear extracts were prepared as previously reported (26).

Abbreviations: Ab, antibody; EMSA, electrophoretic mobility shift analysis; EMYCS, E2F *C-MYC* Specific; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; wt, wild-type.

Electrophoretic mobility shift analysis

Gel shifts were performed with labeled double-stranded oligonucleotides encompassing the E2F elements from the DHFR, E2F1, C-MYC, C-MYB and CDC2 promoters (see supplementary data available at *Carcinogenesis* Online). Binding reactions were performed as described previously (26). Antibodies (Abs) against E2F1–E2F6 and p107 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California). The anti-E2F7 polyclonal Abs BCN4774, BCN4775 and BCN4776 recognize E2F7-A, E2F7-B or both isoforms, respectively, and were obtained from AntibodyBcn (Barcelona, Spain). The anti-DP1 and anti-pRb N9 polyclonal rabbit Abs were described previously (26).

Ultraviolet cross-linking experiments, methylation interference and chromatin immunoprecipitation analysis

These assays were carried out essentially as described in refs (26,27,28), respectively. Rabbit anti-p130 (Santa Cruz Biotechnology) was used for chromatin immunoprecipitation.

Construction of vectors

pBG-LUC has been described previously (29) and was generated by cloning the β -globin TATA box upstream from the luciferase gene in the pGL2-Basic plasmid. Details on the construction of the wild-type (wt) version of 2xmyc-BG-LUC and its mutant derivatives are provided in supplementary data (available at *Carcinogenesis* Online). The generation of pE μ -CMYC, pGL2-CMYCwt, a DNA insert encompassing the C-MYC P1 and P2 promoters (–274 to +66 relative to the P2 transcription start site), pEnh-E μ -CMYC and their mutant derivatives is described in the supplementary data (available at *Carcinogenesis* Online).

Transfections and reporter gene assays

U2OS, Saos2 and 293-T cells were transfected employing the calcium phosphate method (30) whereas DG75, Jurkat, K562 and Mutu-1 cells were transfected by electroporation (30). Transfections included 5 μ g of appropriate luciferase reporter plasmid plus 1 μ g of pCMV- β gal and 24 μ g carrier plasmid [Bluescript (Stratagene, La Jolla, California)].

PBMC cells were harvested and resuspended at a density of 1×10^8 cells/ml in RPMI 1640 and, then, electroporated as described previously (31). Transfected PBMC were splitted in two 35 mm diameter dishes, incubated in RPMI with 10% FCS at 37°C and activated or not with 5 μ g/ml leucoagglutinin plus 50 units/ml interleukin-2 for 24 h. PBMC transfection included 40 μ g pEnh-E μ -CMYC reporter vectors and 5 μ g pRL-SV40 (Promega, Madison, California).

Results

The E2F element in the C-MYC promoter binds a unique factor that does not interact with E2F elements from several other promoters

To address the possibility that the C-MYC E2F element is regulated differently than E2F elements in promoters that are activated later in the cell cycle, electrophoretic mobility shift analysis (EMSA) was employed to compare the binding of nuclear factors to the E2F element in the C-MYC promoter relative to that from genes that are induced during S phase or the G₁–S phase boundary (Figure 1). Employing nuclear extract from the non-transformed human lymphoblastoid cell line, X50-7, four major protein complexes are observed (I–IV) using labeled E2F sites from the C-MYC and E2F1 promoters (Figure 1C and D, respectively).

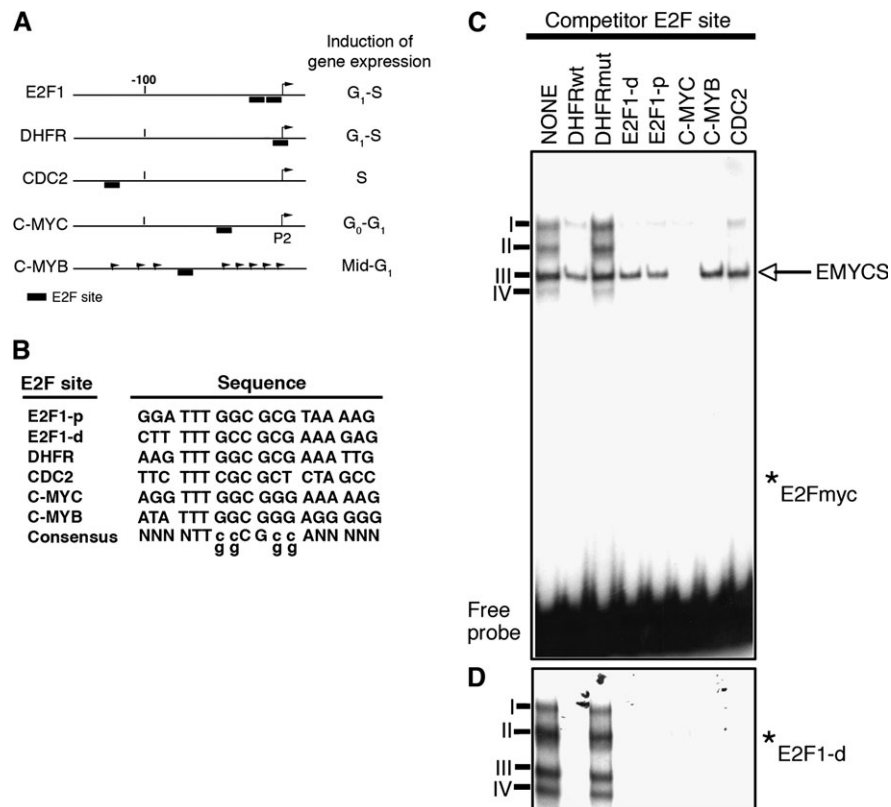


Fig. 1. Identification of a DNA-binding species that interacts solely with the E2F element within the C-MYC promoter. (A) Schematic representation of several E2F-regulated cellular promoters. Arrows indicate the transcription initiation sites and black boxes represent E2F elements. (B) Alignment of E2F elements from the E2F1, DHFR, CDC2, C-MYC and C-MYB promoters and the consensus E2F-binding site. Complex formation employing nuclear extracts from the lymphoblastoid cell line, X50-7 and radiolabeled E2F elements from the C-MYC (*E2Fmyc) (C) and E2F1 (*E2F1-d) (D) promoters were analyzed by EMSA. Reaction mixtures were preincubated in the absence (indicated as None) or in the presence of a 100-fold excess of the indicated unlabeled competitor oligonucleotides. The position of complexes I–IV is indicated. DHFRwt, C-MYC, C-MYB and CDC2 denote oligonucleotides corresponding to the E2F sites within the DHFR, C-MYC, C-MYB and CDC2 promoters, respectively. Oligonucleotides corresponding to the distal and proximal E2F sites found in the E2F1 promoter are indicated as E2F1-d and E2F1-p, respectively. DHFRmut indicates a mutant DHFR probe. The free E2Fmyc probe is indicated. Free probes in (D) and the remaining figures along the manuscript corresponding to EMSA assays are not shown.

These four complexes are apparently common to the E2F probes derived from the *DHFR*, *C-MYC* and *CDC2* promoters [(26) and data not shown]. Competition experiments were performed to assess the specificity of the protein–DNA interactions observed with the E2F site from the *C-MYC* promoter and the E2F1-d element. Assays employing a labeled *C-MYC* E2F element as a probe revealed that complexes I, II and IV are competed by each of the E2F elements tested (Figure 1C). However, complex III was only efficiently competed by a self-oligonucleotide (Figure 1C, *C-MYC* competed lane), whereas it was only partially competed by wt E2F elements from the other promoters (Figure 1C). This result suggests that the *C-MYC* E2F site forms a specific complex (referred to here as EMYCS) that is unique to the *C-MYC* E2F element and that migrates at the same position in EMSA assays than other E2F-containing complexes also present in band III.

As a control for E2F binding in our assays, we could observe the formation of complexes I–IV using labeled E2F1-d site as a probe. In this case, the four complexes were completely and efficiently competed by all other E2F elements tested, except when a mutant *DHFR* element (*DHFRmut*) was used, indicating the presence of E2F or E2F-related factors in complexes I–IV (Figure 1D).

EMYCS is not recognized by Abs against E2F and pRb family members

It is well established that DP1 is a major component of the vast majority of E2F–DNA complexes (22) and that E2F elements can form complexes such as DP1–E2F4–p107 (complex I), DP1–E2F–pRb (complex II) and one or more free DP1–E2F (complexes III–IV) with nuclear extracts from asynchronous non-transformed cell cultures (22,26,32). Accordingly, a DP1 Ab inhibits the formation of most of these complexes when E2F-specific probes are used (26).

Employing X50-7 nuclear extracts and the *C-MYC* or the E2F1-d probes, complexes I, II and IV were affected by an anti-DP1 Ab (Figure 2A–D), whereas complexes I and II were inhibited by anti-p107 and anti-pRb Abs, respectively (Figure 2A and C). Additionally, formation of complexes I and IV was inhibited by anti-E2F4 and anti-E2F5 Abs, respectively (Figure 2B and D). These data suggest that complexes I, II and IV formed with the *C-MYC* probe are similar to those obtained with other E2F elements contained in other promoters.

In these experiments, complex III exhibited again a unique behavior when the *C-MYC* probe was used. Thus, an anti-E2F4 Ab barely affected its formation with the *C-MYC* probe (Figure 2B), but completely inhibited its appearance with the E2F1-d (Figure 2D), or with other probes such as *DHFR*, *C-MYC* or E2F1-p [(26) and data not shown].

It is clear that the E2F-1, -2, -3, -6 and -7 Abs did not significantly affect formation of complexes I–IV with the E2Fmyc or E2F1-d probes (Figure 2B and D and supplementary Figure 1A is available at *Carcinogenesis* Online). To demonstrate that this negative result was not due to the fact that these Abs did not work in our EMSA assays, we carried out supershift assays incubating these Abs with nuclear extracts from E2F-1, -2, -3, -6 or -7-transfected cells. All Abs were able to specifically supershift or inhibit formation of their corresponding E2F complexes (supplementary Figures 1 and 2 are available at *Carcinogenesis* Online). Hence, the lack of effect of these Abs in our EMSA assays is probably due to low relative abundance of these proteins in nuclear extracts from the employed cells rather than to inability of these Abs to function in this type of assay.

Because complex III formation with the *C-MYC* probe was barely affected by other E2F-binding oligonucleotides, by the anti-E2F4 Ab or by any other anti-E2F Abs, it is very likely that although this complex might contain some DP1–E2F4, its major protein component (EMYCS) is a factor distinct from known E2F family members.

Relative molecular weight estimation of EMYCS DNA-binding components

Because EMYCS binds the E2Fmyc probe but not the other E2F probes tested, we hypothesized that, by using ultraviolet (UV) cross-linking, we might uncover a protein as a constitutive component

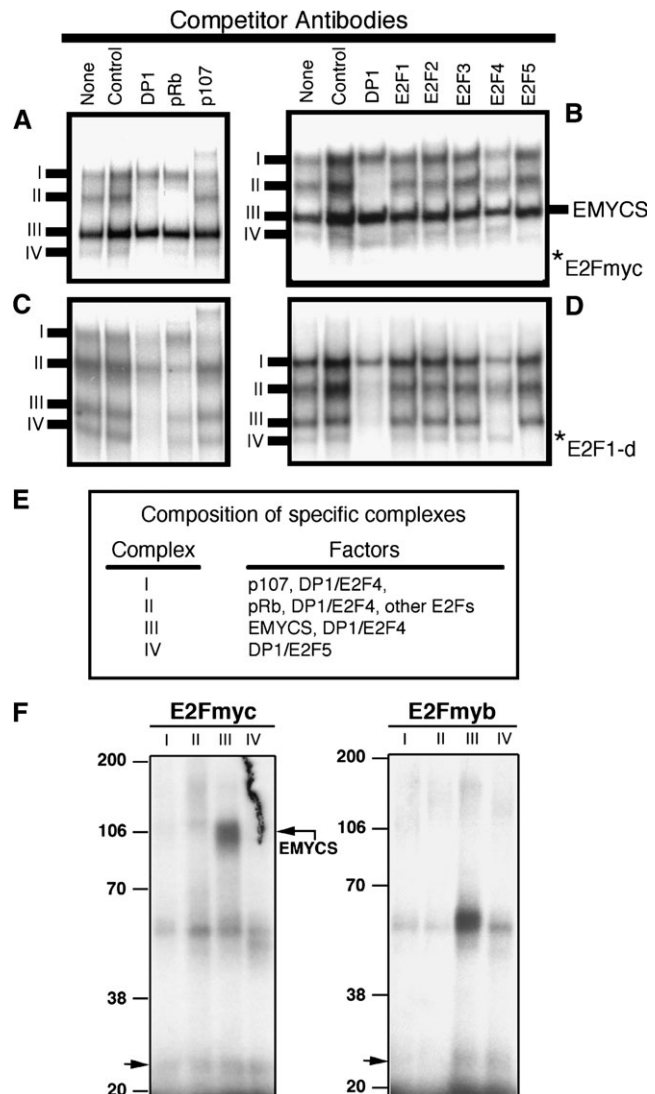


Fig. 2. Identification of E2F or pRb family members in E2Fmyc and E2F1-d protein–DNA complexes. Binding reactions were performed using X50-7 nuclear extracts and either E2Fmyc (A and B) or E2F1-d (C and D) probes. Extracts were preincubated in the absence (None) or in the presence of Abs against the indicated proteins for 20 min prior to addition of the labeled probes. Control denotes a DP1 preimmune rabbit polyclonal Ab. The position of complexes I–IV is indicated. (E) Summary of the results shown in panels A–D detailing the composition of specific complexes formed with the E2Fmyc probe. (F) Relative molecular weight estimation of DNA-binding components of complexes formed with the E2Fmyc and E2Fmyb probes. UV cross-linking analysis of complexes I–IV was performed employing X50-7 nuclear extracts and bromodeoxyuridine-substituted E2Fmyc and E2Fmyb probes. Following native gel electrophoresis, the gel was irradiated with UV light, and the indicated complexes were excised from the gel. Labeled proteins in the excised bands were then separated by electrophoresis in a sodium dodecyl sulfate–10% polyacrylamide gel. The gel mobility of prestained protein molecular weight markers following compensation for the size of the cross-linked probes (11 kDa) is indicated in kilodaltons. Arrows indicate the positions of EMYCS and that of a 25 kDa band that is common to all lanes and probes.

of E2Fmyc probe-associated complex III that would not be present in the complex III formed with the other E2F probes. UV cross-linking of complex III on the *C-MYC* E2F element revealed a strong and specific 105 kDa band that was not observed in the complex III formed with the *DHFR* and *C-MYC* elements (Figure 2F and data not shown). Additional proteins with estimated molecular weights close to 55 kDa were also observed associated to complex III on the E2Fmyc probe, but proteins with similar apparent masses were

also found with complex III on the other E2F probes (Figure 2F and data not shown). These data strongly suggest that the 105 kDa band probably represents a major DNA-binding component of EMYCS. We also performed UV cross-linking experiments using the Burkitt's lymphoma cell line, DG75, and like the results obtained with X50-7 extracts, a 105 kDa band was detected that was probably attributable to a factor in the EMYCS complex (data not shown). Several other bands were observed with complexes I–IV, most of which were in the range of the molecular weights for known E2F species (~45–65 kDa) employing the E2Fmyc probe (Figure 2F). A 25 kDa band was observed that appeared to be common to every probe and each of the other complexes tested (Figure 2F, pointed with a short arrow).

EMYCS factors recognize a distinct nucleotide sequence than E2F-containing complexes

To further analyze EMYCS, we used methylation interference analysis to compare the nucleotide-binding specificity of this complex with

that of complexes known to contain only E2F. Our results showed that methylation of the G residue at position 8 did not affect binding of EMYCS but it interfered with the binding of E2F-containing complexes (Figure 3A). No differences in the methylation interference patterns were observed between any complex employing the antisense strand, probably due to a dearth of G and A residues. A summary of the nucleotides required for binding of the different complexes is shown in Figure 3B.

We used this information to design mutated oligonucleotides that interact with EMYCS, but not with E2F (E2Fmyc-sp) by specifically replacing nucleotide at position 8 (G–T), as indicated in Figure 3C (myc-sp). Oligonucleotides that could bind E2F, but not EMYCS (E2Fmyc-E2F), or oligonucleotides unable to interact with any factor (E2Fmyc-null) were also designed. The sequence of the mutated oligonucleotides is indicated in Figure 3C.

Complex formation employing X50-7 nuclear extracts and the wild-type E2Fmyc probe (E2Fmyc-wt) was competed with a

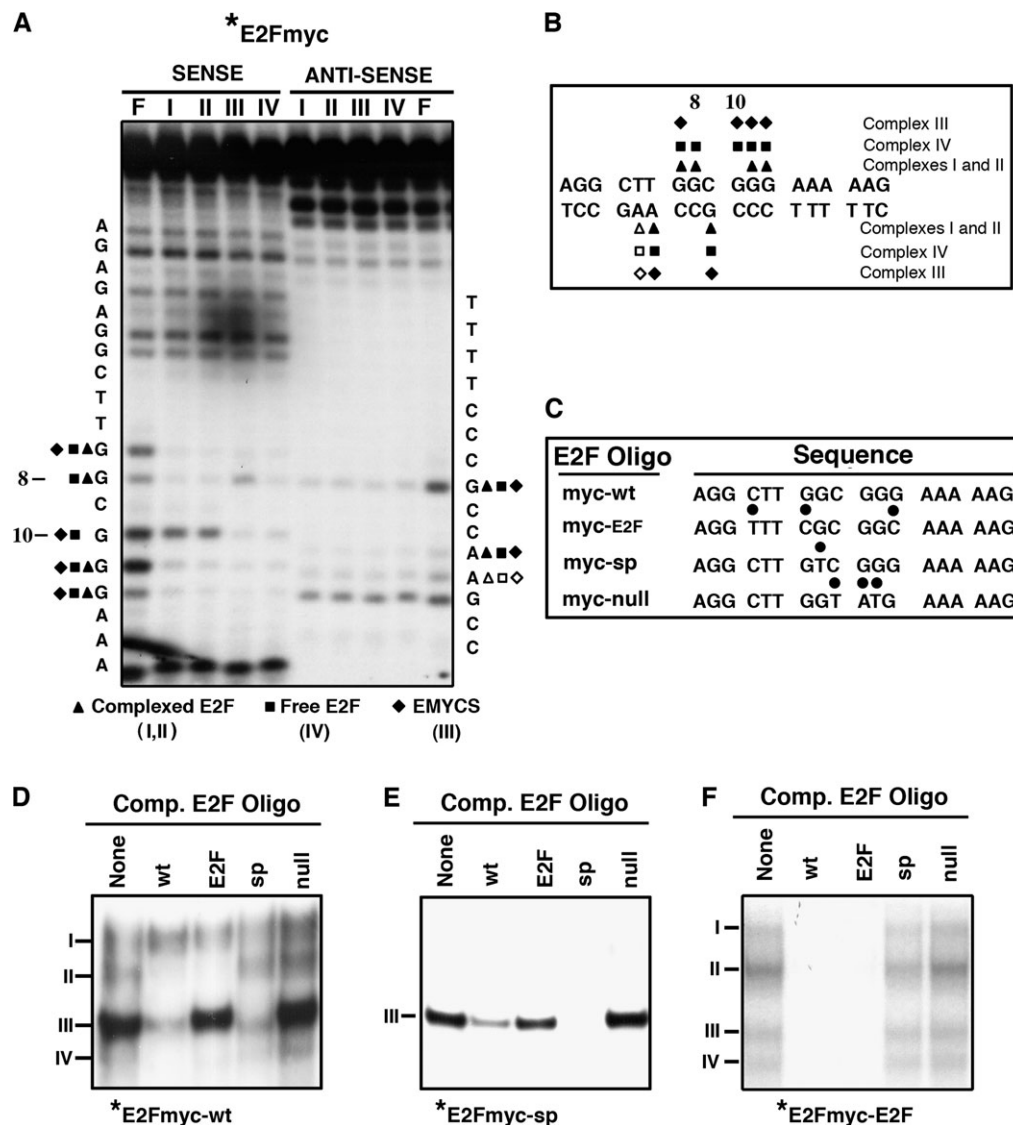


Fig. 3. EMYCS and E2F complexes interact with overlapping DNA sequences. (A) Methylation interference analysis of complexes I–IV was performed employing X50-7 nuclear extracts and the E2Fmyc probe. The sequence of the sense and antisense strands is indicated adjacent to the gel. Triangles, diamonds and squares indicate bases whose methylation completely (filled) or partially (empty) blocked formation of complexes I and II (triangles), III (diamonds) and IV (squares). The cleavage pattern observed with an unbound probe (F) is also shown. (B) Summary of methylation interference analysis shown in A. (C) Sequence of wt and mutant E2Fmyc probes. For each mutant, alterations relative to the wt sequences are indicated by dots. (D–F) Complexes formed between X50-7 nuclear factors and radiolabeled E2Fmyc-wt (D), E2Fmyc-sp (E) and E2Fmyc-E2F (F) probes were analyzed by EMSA. Reaction mixtures were incubated in the absence (indicated as None) or in the presence of a 100-fold excess of the indicated unlabeled competitor oligonucleotides. The position of complexes I–IV is denoted.

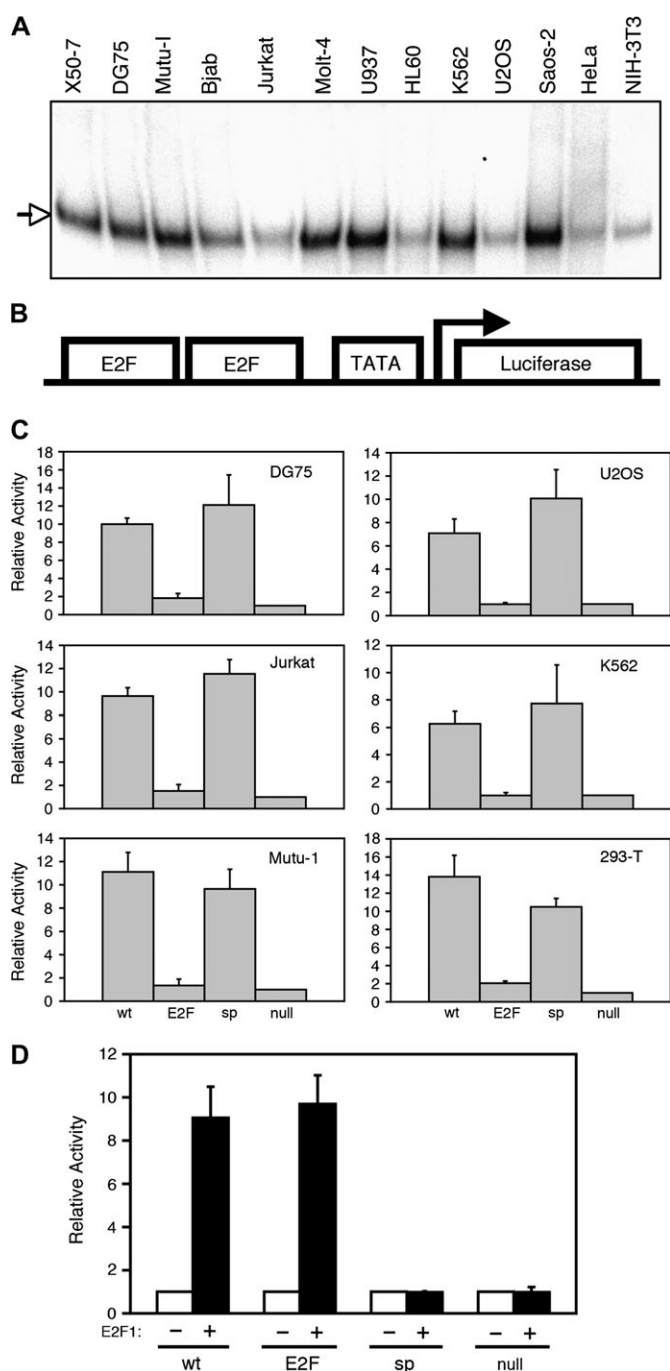


Fig. 4. EMYCS is expressed in a broad range of cell lines and elicits transactivation of a minimal luciferase reporter plasmid. (A) Complex formation employing the radiolabeled E2Fmyc-sp probe and nuclear extracts from the lymphoblastoid cell line, X50-7, the Burkitt's lymphoma DG75 and Mutu-1, the B-cell lymphoma Bjab, the T-cell leukemic Jurkat and Molt-4, the myeloid U937 and HL60, the erythromyeloid K562, the osteosarcoma U2OS and Saos-2, the cervix carcinoma HeLa and the mouse fibroblast NIH-3T3 cell lines was analyzed by EMSA. Nuclear extracts were prepared from asynchronously growing cells. The arrow indicates the position of EMYCS. (B) Schematic representation of the reporter plasmids used. Two copies of the wt E2F site from the *C-MYC* promoter or its mutant derivatives that interact only with E2F (E2F), only with EMYCS (sp) or with none of them (null) were cloned immediately upstream from the β -globin TATA box in pBG-LUC. (C) The indicated 2xmyc-BG-LUC plasmids were cotransfected with pCMV- β gal in asynchronously growing DG75, U2OS, Jurkat, K562, Mutu-1 and 293-T cells. Forty hours later, cell extracts were prepared and luciferase and β -galactosidase assays were performed. Luciferase values were normalized for β -galactosidase activity and represent the means of at

self-oligonucleotide (wt), but not with the E2Fmyc-null (null) mutant (Figure 3D). Notably, the E2Fmyc-sp oligonucleotide (sp) inhibited formation of complex III, but did not affect complexes I, II and IV (Figure 3D). In contrast, the E2Fmyc-E2F oligonucleotide (E2F) inhibited complexes I, II and IV, but did not affect complex III appearance (Figure 3D).

Complex formation employing the E2Fmyc-sp probe rendered only one retarded complex that migrated with a mobility of complex III and whose formation was inhibited by E2Fmyc-wt and E2Fmyc-sp, but not by E2Fmyc-E2F or E2Fmyc-null (Figure 3E). In addition, the E2F element from the *DHFR* promoter (which only interacts with E2F) did not compete binding of EMYCS to the E2Fmyc-sp probe (data not shown). Competition by the wt *C-MYC* E2F oligonucleotide was less effective than that by E2Fmyc-sp. Because the E2Fmyc-sp does not bind E2F proteins, it may be a better competitor than the wt E2F site. Alternatively, the substitution at position 8 may have specifically increased the affinity of EMYCS binding.

As expected, E2Fmyc-E2F formed complexes I, II, III and IV (Figure 3F) and binding of each of these complexes was specifically competed by E2Fmyc-E2F and by E2Fmyc-wt. On the other hand, E2Fmyc-sp and E2Fmyc-null did not affect binding of these complexes to E2Fmyc-E2F (Figure 3F).

Binding of free E2F-5 (complex IV), as well as that of EMYCS, was ablated by methylation of the G residue at position 10, whereas binding of the majority of E2F species found in the pRb (II) and the p107 (I) complexes was unaffected by methylation of this residue. At this time, it is not possible to distinguish whether this variation represents the difference in E2F subunit composition between complexes I and II versus complex IV or whether the association with pRb family members alters the binding specificity of E2F proteins.

In summary, the factors present in EMCYS seem to be different from any known E2F family member because the DNA contact residues for EMYCS are distinct but overlapping with residues required for binding of E2F proteins; the approximate molecular weight of the DNA-binding component of EMCYS is 105 kDa, which is much larger than that of activator E2Fs; none of the anti-E2F or anti-DP Abs affected its interaction with the *C-MYC* E2F site and it did not bind to other E2F elements.

Analysis of EMCYS complex function in *C-MYC* promoter regulation

Employing mutant or wt oligonucleotide probes, we observed that EMYCS was significantly expressed in nuclear extracts from every cell line tested to date, including 14 human cell lines from different tissues and mouse NIH-3T3 cells (Figure 4A and data not shown), suggesting that it might be ubiquitously expressed. Differences in the intensity of the bands are not probably due to differences in EMYCS abundance or affinity for the probe because relative complex abundance varied slightly among experiments for each cell line (data not shown).

To assess the role of EMYCS on *C-MYC* promoter activity and the capacity of this factor to interact *in vivo* with the *C-MYC* E2F element, we generated luciferase reporter plasmids (2xmyc-BG-LUC) containing a TATA box and two copies of the *C-MYC* E2F element (wt) (see Figure 4B and experimental procedures). We also employed E2F sites that contained the point mutations indicated in Figure 3C to create reporter plasmids with E2F elements that interacted only with E2F (E2F), only with EMYCS (sp) or with no factor (null).

least four different experiments. The luciferase activity is shown relative to that of the null construct. (D) The indicated 2xmyc-BG-LUC plasmids were cotransfected with pCMV- β gal in asynchronously growing Saos-2 cells in the presence (+) or the absence (-) of plasmids encoding DP1 and E2F1. Forty hours later, cell extracts were prepared and luciferase and β -galactosidase assays were performed. Luciferase values were normalized for β -galactosidase activity and represent the means of at least four different experiments. The luciferase activity is shown relative to that in the absence of DP1 + E2F1.

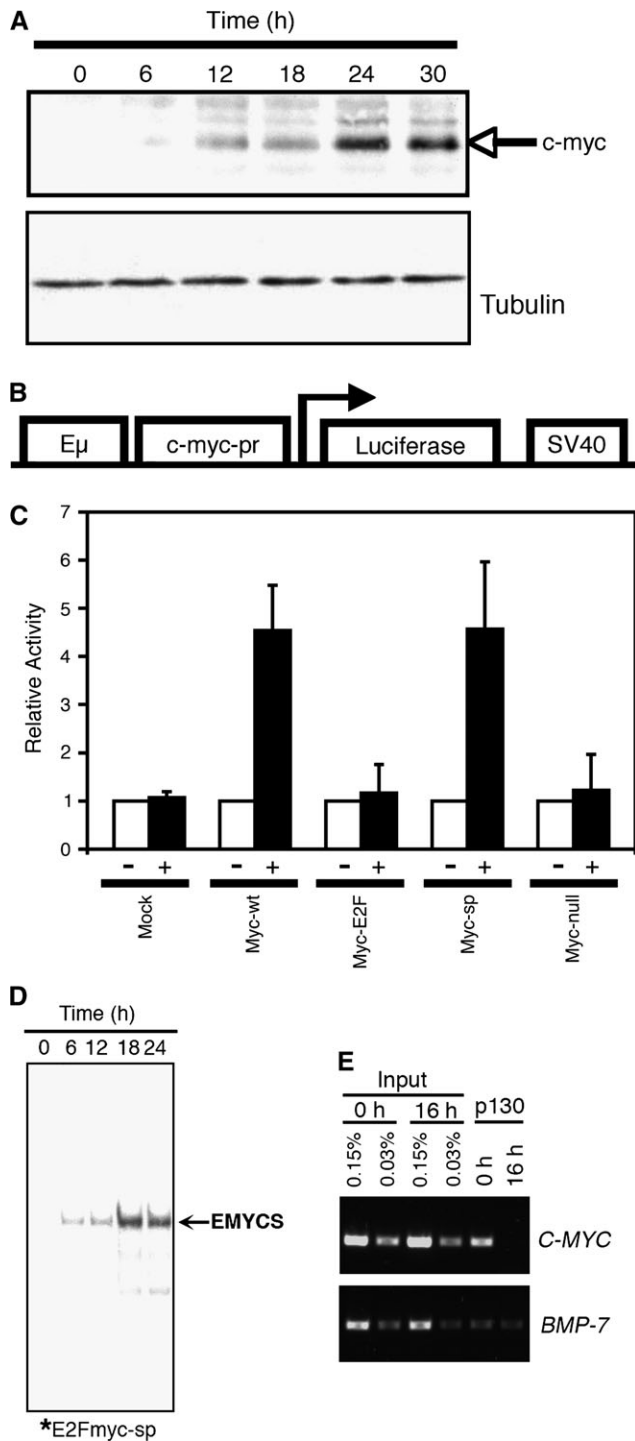


Fig. 5. Activation of the *C-MYC* promoter by E2F and EMYCS through the E2F element during exit from quiescence. **(A)** Whole-cell extracts were prepared from peripheral blood T cells activated for the indicated periods of time with leucoagglutinin plus interleukin-2 to exit from quiescence. These extracts were fractionated on an 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a nitrocellulose membrane and probed with either the 9E10 anti-*C-MYC* (top panel) or the DM 1A anti-tubulin (bottom panel) monoclonal Abs. **(B)** Schematic representation of the reporter plasmids used (pEnh-Eμ-CMYC). A DNA fragment comprising the Eμ enhancer followed by a DNA insert encompassing the *C-MYC* P1 and P2 promoters, but excluding the purine-rich strand and the pausing-related sequences, was cloned into a pGL2 vector that carries the SV40 enhancer downstream from the luciferase gene. Reporter vectors with a wt E2F element as well as vectors with a mutated E2F site that interacted only with E2F, only with EMYCS or with none of them were also generated. **(C)** The

These luciferase reporter plasmids were transfected in different cell lines, and the luciferase activity of cell extracts was measured to assess the respective transactivation capacity of each factor. As shown in Figure 4C, the wt sites and the mutant elements that could only interact with EMYCS (sp) both elicited 6–14 times more luciferase activity than the mutant that could bind no factors (null) in every cell line. Luciferase activities using the mutant reporter driven only by E2F (E2F) and the null mutant (null) were almost identical (Figure 4C). These results suggest that EMYCS binds *in vivo* to the *C-MYC* E2F site, that it has transcriptional transactivation activity and that it might be a *C-MYC* promoter transactivator.

To assess that E2F factors only bind *in vivo* to the wt E2Fmyc element and the site mutated to interact only with E2F (E2F), but not with the mutated elements that interacted *in vitro* with no factor (null) or only with EMYCS (sp), we cotransfected the above mentioned luciferase reporters with or without plasmids encoding E2F1 and DP1. Our results clearly indicate that E2F1 activated the Myc-wt and Myc-E2F reporters, but not the Myc-sp or Myc-null reporters (Figure 4D). These data strongly support that E2F factors are unable to interact *in vivo* with the E2Fmyc site mutated to interact only with EMYCS.

Regulation of *C-MYC* expression requires additional unidentified control elements located outside the known regulatory sequences (16). Because insertion of immunoglobulin enhancers downstream from the coding region and upstream from the P1 and P2 *C-MYC* promoters mimicked endogenous *C-MYC* transcription regulation (15,17), we constructed a vector with the Eμ enhancer cloned directly upstream from these promoters in the pGL2-Enhancer vector. It is important to note that this vector contains the SV40 enhancer downstream from the luciferase gene (see Figure 5B and experimental procedures).

The wt (Myc-wt) and mutant derivative pEnh-Eμ-CMYC plasmids whose E2F element could interact only with E2F (Myc-E2F), only with EMYCS (Myc-sp) or with none of these factors (Myc-null) were transfected in peripheral blood T cells. Most of these cells are quiescent and do not express *C-MYC*, but they readily activate *C-MYC* messenger RNA and protein expression and enter the cell cycle following stimulation [Figure 5A and (12)]. The luciferase activity from resting and stimulated cells was measured to assess the respective transactivation capacity of each factor following T-cell activation. As shown in Figure 5C, the reporter plasmids that contained a wt E2F site (Myc-wt) or a mutant site that interacted only with EMYCS (Myc-sp) were activated 5- to 6-fold following T-cell stimulation, whereas reporter plasmids that contained mutant E2F sites that interact only with E2F (Myc-E2F) or with no factor (Myc-null) were barely activated. The vector that contained both

indicated pEnh-Eμ luciferase reporter plasmids-containing wt (Myc-wt) or mutant E2F elements that interact only with E2F (Myc-E2F), only with EMYCS (Myc-sp) or with none of them (Myc-null) were cotransfected with pRL-SV40 into PBMC. A reporter plasmid that contained both enhancers but no *C-MYC* promoter was also employed (Mock). Following transfection, cells were splitted and either activated for 24 h with leucoagglutinin plus interleukin-2 to exit from quiescence (+) or left untreated (–). Firefly and Renilla luciferase activities were measured in cell extracts from both activated and untreated cells. Luciferase values for each indicated reporter plasmid are shown relative to untreated cells. The mean and SD of three independent experiments is shown. **(D)** Complex formation employing nuclear extracts from peripheral blood T cells activated as in **(A)** for the indicated periods of time and the radiolabeled E2Fmyc-sp probe was analyzed by EMSA. The arrow indicates the position of EMYCS. **(E)** Resting (0 h) and activated (16 h) T cells were analyzed by chromatin immunoprecipitation with an anti-p130 Ab. Different dilutions of input chromatin DNA (Input) or DNA extracted from chromatin immunoprecipitated with the anti-p130 Ab were subjected to polymerase chain reaction amplification using oligonucleotides flanking the proximal *C-MYC* promoter and containing the E2F site (*C-MYC*) or oligonucleotides for the 3'-UTR of the *BMP7* gene (*BMP7*). The products separated by agarose gel electrophoresis are shown.

enhancers, but no *C-MYC* promoter, was not activated following T-cell stimulation (Figure 5C). Hence, only the *C-MYC* promoter constructs that contained the wt E2F site or the mutated site that interacted with EMYCS, but not with E2F, were activated *in vivo* during exit from quiescence.

Nuclear extracts were prepared from peripheral blood T cells stimulated for different periods of time and the interaction of these extracts with the E2Fmyc-sp probe was assessed by EMSA. As shown in Figure 5D, EMYCS was almost undetectable in resting cells, but its binding significantly increased 12 h after cell activation and maximal binding was observed 18–24 h following exit from quiescence. The pRb family member p130 is a transcriptional repressor that is usually associated to E2F elements during quiescence. Chromatin immunoprecipitation assays clearly show that binding of p130 to the E2Fmyc site decreased 16 h after lymphocytes stimulation (Figure 5E). Together, our results strongly suggest that the E2F element plays a crucial role during activation of the *C-MYC* promoter in cells coming out of quiescence and that interaction of EMYCS with this element is required to achieve full activation of the promoter in these cells.

Discussion

C-MYC expression activation by growth factors is mediated, at least partly, by its E2F element (13) through unknown mechanisms. Because induction of *C-MYC* expression takes place much earlier than p130 is phosphorylated and free E2F is released, we hypothesized that occupancy of the E2F site by factors distinct from E2F might allow this element to escape from the repressor activity of the E2F–p130 complexes. We have discovered a nuclear factor (EMYCS) that interacts with the E2F site from the *C-MYC* promoter that is unique and distinct from known E2F family members. We also provide evidence that this novel factor is a transcriptional activator that might be required to avoid the recruitment of pRb family members to the *C-MYC* E2F site at early phases of G₁ and to elicit *C-MYC* promoter activation during exit from quiescence.

Although EMYCS interacts with nucleotide residues that partially overlap with those required for E2F binding, all our data indicate that this factor is different from known E2F factors. There is a G nucleotide (G8) that is required for E2F binding but not for EMYCS binding, indicating that nucleotide recognition sequences are different for EMYCS and E2F factors. Furthermore, the estimated molecular size of EMYCS (105 kDa) is different from most E2F family members, although it is similar to that of E2F7. However, E2F7 is a transcriptional repressor (33,34) while EMYCS has transcriptional transactivation capacity, as we show herein. In addition, neither anti-E2F7 nor Abs to other DP or E2F family members affected formation of the EMYCS complex. Finally, while most E2F family members interact with the E2F elements from the *C-MYC*, *DHFR* and *E2F1* promoters *in vitro* (J.Álvarez-Blanco, L.Martínez-Gac, E.Calonge, M.Rodríguez-Martínez, I.Molina-Privado, J.M.Redondo, J.Alcamí, E.K.Flemington and M.R.Campanero, unpublished data), EMYCS only binds to the *C-MYC* E2F site.

At this time, the identities of factors in the EMYCS complex remain to be determined. It was previously reported that recombinant ets-1 and ets-2 bind to the *C-MYC* E2F element (35). In that study, however, no experiments were shown in which ets-1- or ets-2-containing complexes were detected employing cell extracts. Moreover, the high molecular weight estimated for EMYCS suggests that this factor is not ets-1 or ets-2. Finally, employing ets-1- and ets-2-binding sites in oligonucleotide competition studies, we were unable to detect any evidence of ets factor binding to the *C-MYC* E2F element (supplementary Figure 3 is available at *Carcinogenesis* Online). Therefore, any binding of ets-1 or ets-2 from nuclear extracts must be significantly lower than the level of binding observed for EMYCS or E2F family members.

The *C-MYC* E2F element does have some homology to previously reported Stat DNA-binding sites and treatment of HepG2 cells with

interleukin 6 leads to Stat3 binding and activation of *C-MYC* through its E2F site (36). However, EMYCS binding to this element was not affected by Abs to Stat3 or Stat5 or by oligonucleotides known to interact with Stat3 and Stat5 (supplementary Figure 4 is available at *Carcinogenesis* Online). Moreover, binding of Stat to their DNA-binding sites usually requires cell activation by cytokines or chemokines. Stat3 or Stat5 is constitutively activated in some, but not every tumor cell lines (37,38). Specifically, the Burkitt's lymphoma cell line DG75 shows no basal activation of Stat-3 or Stat-5 DNA-binding activity (39). We have shown, however, that EMYCS is present in a number of cell lines from different tissues, including DG75 cells, and that it readily binds the *C-MYC* E2F element, even in the absence of any cell treatment. Furthermore, we have observed that EMYCS has transcriptional transactivation capacity in untreated cell lines such as DG75, U2OS, Mutu-1, Jurkat and 293-T. Our results therefore suggest that EMYCS is constitutively active in these cell lines. Hence, EMYCS plays a role in non-stimulated cells and is not probably to be a known member of the Stat family of transcription factors.

NFATc1 has also been shown to bind to and activate the *C-MYC* promoter through a site that overlaps with the E2F element (40). To assess whether EMYCS was a NFAT family member, we used an antiserum directed against a common epitope of the DNA-binding domain of all NFAT members (all-NFAT Ab) that completely abolished formation of NFAT complexes in EMSA assays (41). This Ab did not affect binding of EMYCS to the E2F element from the *C-MYC* promoter, but inhibited formation of specific complexes with the distal NFAT site of the human IL-2 promoter (supplementary Figure 5A is available at *Carcinogenesis* Online). Furthermore, the oligonucleotide corresponding to the NFAT-binding site did not compete the binding of EMYCS to the E2Fmyc probe (supplementary Figure 5B is available at *Carcinogenesis* Online). Finally, NFATc1 binding to DNA requires activation in response to an increase in the intracellular calcium concentration whereas EMYCS binding to the *C-MYC* E2F element is constitutive in a number of cell lines from different tissues. These data therefore suggest that EMYCS is not a NFAT family member.

To identify the protein or proteins present in EMYCS, we have carried out pull-down experiments using beads conjugated with the oligonucleotide that binds specifically to complex III. Unfortunately, EMYCS non-specifically bound the different beads that were employed, even in the absence of oligonucleotides (data not shown). Other experimental approaches will be therefore required to know the makeup of this complex.

Since the DNA recognition sequences of EMYCS overlaps with the E2F element, EMYCS complex formation is likely mutually exclusive with the binding of E2F proteins, suggesting that competition between these factors for binding to the *C-MYC* E2F element might dictate the mode of regulation governing *C-MYC* expression. Thus, this element might be a potent *C-MYC* expression repressor in quiescent cells by recruiting pRb family members through E2F (Figure 6A). Following cell growth stimulation and entry into the cell cycle, most E2F-regulated genes are induced near the G₁–S phase transition, once pRb family members have become hyperphosphorylated (22). *C-MYC*, however, is turned on quickly after the induction of cell proliferation, much earlier than kinases responsible for pRb family proteins phosphorylation become active. We propose that *C-MYC* induction during exit from quiescence might depend on the binding of factors such as EMYCS to its E2F site and exclusion of the E2F–pRb repressor complex from the promoter, rather than on the release of pRb family members from E2F (Figure 6B). In accordance with our model, we have shown that, *C-MYC* expression, binding of EMYCS to the *C-MYC* E2F site, and *C-MYC* promoter activity all are readily induced following exit from quiescence in T lymphocytes with a similar kinetics. EMYCS interaction with the E2F element not only would prevent *C-MYC* promoter repression but might also elicit its activation since we have observed that this factor has transcriptional transactivation capacity and is required for *C-MYC* promoter activation during exit from quiescence.

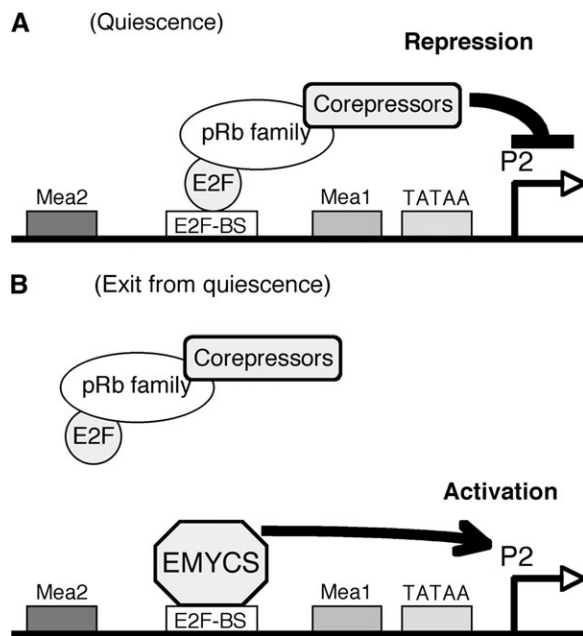


Fig. 6. Model for the regulation of *C-MYC* transcription by E2F and EMYCS through the E2F DNA-binding site. **(A)** E2F can negatively regulate the *C-MYC* promoter during G_0 probably through its association with members of the pRb family and its recruited corepressors. **(B)** Stimuli that induce exit from quiescence would elicit binding of EMYCS to the E2F element, release from E2F-pRb family repression and transcriptional transactivation by EMYCS, while leaving pRb family members associated to E2F factors.

Finally, our findings may be relevant to the possible role of *C-MYC* overexpression in oncogenesis. Since EMYCS is required for *C-MYC* gene activation during exit from quiescence, it is tempting to speculate that deregulated expression of this factor may, in some cases, contribute to the overexpression of *C-MYC* that has been observed in multiple tumors (1). It could be therefore of great importance to identify the factors present in EMYCS in the next future and determine its role in tumor formation and *C-MYC* expression.

Supplementary material

Supplementary Data and Figures 1–5 can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

Funding

Spanish Ministerio de Educacion y Ciencia (SAF2004-05888 and SAF2007-60647) to M.R.C. L.M.-G. and I.M.-P. are recipients of a Formacion del Profesorado Universitario fellowship (Spanish Ministerio de Educacion y Ciencia) and E.C. is recipient of a fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias.

Acknowledgements

We thank Ed DesJardins for kindly providing the -157mycCAT reporter plasmid. We are indebted to T.Iglesias for critically reading of the manuscript.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Adhikary, S. *et al.* (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 635–645.
- Chung, H.J. *et al.* (2005) c-myc expression: keep the noise down!. *Mol. Cells*, **20**, 157–166.
- Dang, C.V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 1–11.
- Bieche, I. *et al.* (1999) Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay. *Cancer Res.*, **59**, 2759–2765.
- Mai, S. (1994) Overexpression of c-myc precedes amplification of the gene encoding dihydrofolate reductase. *Gene*, **148**, 253–260.
- Mai, S. *et al.* (1996) c-Myc overexpression associated DHFR gene amplification in hamster, rat, mouse and human cell lines. *Oncogene*, **12**, 277–288.
- Cerni, C. *et al.* (1986) c-myc and functionally related oncogenes induce both high rates of sister chromatid exchange and abnormal karyotypes in rat fibroblasts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **132**, 193–201.
- Chernova, O.B. *et al.* (1998) MYC abrogates p53-mediated cell cycle arrest in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-treated cells, permitting CAD gene amplification. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 536–545.
- Mai, S. *et al.* (1996) Genomic instability in MycER-activated Rat1A-MycER cells. *Chromosome Res.*, **4**, 365–371.
- Rockwood, L.D. *et al.* (2002) Genomic instability in mouse Burkitt lymphoma is dominated by illegitimate genetic recombinations, not point mutations. *Oncogene*, **21**, 7235–7240.
- Wierstra, I. *et al.* (2008) The c-myc promoter: still MysterY and challenge. *Adv. Cancer Res.*, **99C**, 113–333.
- Kelly, K. *et al.* (1983) Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, **35**, 603–610.
- Mudryj, M. *et al.* (1990) A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J.*, **9**, 2179–2184.
- Polack, A. *et al.* (1991) The intron enhancer of the immunoglobulin kappa gene activates c-myc but does not induce the Burkitt-specific promoter shift. *Oncogene*, **6**, 2033–2040.
- Lavenu, A. *et al.* (1994) The cis-acting elements known to regulate c-myc expression *ex vivo* are not sufficient for correct transcription *in vivo*. *Oncogene*, **9**, 527–536.
- Mautner, J. *et al.* (1996) c-myc expression is activated by the immunoglobulin kappa-enhancers from a distance of at least 30 kb but not by elements located within 50 kb of the unaltered c-myc locus *in vivo*. *Oncogene*, **12**, 1299–1307.
- Hortnagel, K. *et al.* (1995) The role of immunoglobulin kappa elements in c-myc activation. *Oncogene*, **10**, 1393–1401.
- McClellan, K.A. *et al.* (2007) Specific *in vivo* roles for E2Fs in differentiation and development. *Cell Cycle*, **6**, 2917–2927.
- Flemington, E.K. *et al.* (1993) E2F-1 mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 6914–6918.
- Helin, K. *et al.* (1993) Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 6501–6508.
- Blais, A. *et al.* (2007) E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 658–662.
- Johnson, D.G. *et al.* (1998) Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front. Biosci.*, **3**, 447–458.
- Hann, S.R. *et al.* (1985) c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature*, **314**, 366–369.
- Thompson, C.B. *et al.* (1985) Levels of c-myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle. *Nature*, **314**, 363–366.
- Campanero, M.R. *et al.* (1993) ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J. Cell Biol.*, **123**, 1007–1016.
- Campanero, M.R. *et al.* (1999) Distinct cellular factors regulate the c-myc promoter through its E2F element. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 8442–8450.
- Thompson, C.B. *et al.* (1992) Cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel ets-related protein, Elf-1. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 1043–1053.
- Campanero, M.R. *et al.* (2008) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces GADD45 gamma expression via Oct and NF-Y binding sites. *Oncogene*, **27**, 1263–1272.
- Campanero, M.R. *et al.* (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 6481–6486.
- Campanero, M.R. *et al.* (1997) Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 2221–2226.
- Alcami, J. *et al.* (1995) Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J.*, **14**, 1552–1560.

32. Shirodkar, S. *et al.* (1992) The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle regulated manner. *Cell*, **68**, 157–166.
33. de Bruin, A. *et al.* (2003) Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 42041–42049.
34. Di Stefano, L. *et al.* (2003) E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J.*, **22**, 6289–6298.
35. Roussel, M.F. *et al.* (1994) Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1. *Oncogene*, **9**, 405–415.
36. Kiuchi, N. *et al.* (1999) STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J. Exp. Med.*, **189**, 63–73.
37. Buettner, R. *et al.* (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin. Cancer Res.*, **8**, 945–954.
38. Turkson, J. *et al.* (2000) STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*, **19**, 6613–6626.
39. Weber-Nordt, R.M. *et al.* (1996) Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, **88**, 809–816.
40. Buchholz, M. *et al.* (2006) Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J.*, **25**, 3714–3724.
41. Iniguez, M.A. *et al.* (2000) An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23627–23635.

Received July 4, 2008; revised December 11, 2008;
accepted December 26, 2008

SUPPLEMENTARY INFORMATION

MATERIALS AND METHODS

Electrophoretic mobility shift assays.

Gel shifts were performed with the following double stranded oligonucleotides ordered from Invitrogen:

E2F-DHFR-wt (5'-CTAGAGCAATTTTCGCGCCAAACTTG-3' and 5'-GATCCAAGTTTGGCGCGAAATTCGT-3'),
E2F-DHFR-mut (5'-CTAGAGCAATTGCTCGACCAACTTG-3' and 5'-GATCCAAGTTGGTCGAGCAATTGCT-3'),
E2F-E2F1-p (5'-CTAGAGCTCTTTTCGCGGCAAAAAGGAG-3' and 5'-GATCCTCCTTTTTGCCGCGAAAGAGCT-3'),
E2F-E2F1-d (5'-CTAGAGGATTTGGCGCGTAAAAGTGG-3' and 5'-GATCCCACCTTTTACGCGCCAAATCCT-3'),
E2F-CDC2 (5'-CTAGATTTCTTTTCGCGCTCTAGCCG-3' and 5'-GATCCGGCTAGAGCGCGAAAGAAAT-3'),
E2F-C-MYC-wt (5'-CTAGAGAGGCTTGGCGGGAAAAAG-3' and 5'-GATCCTTTTTTCCCGCCAAGCCTCT-3'),
E2F-C-MYB-wt (5'-CTAGACAGATTTGGCGGGAGGGGGG-3' and 5'-GATCCCCCCTCCCGCCAATCTGT-3'),

For the E2F-c-myc mutants, the point-mutations indicated in Fig. 3 were employed. In addition, double stranded oligonucleotides previously reported to bind, or not, ets-1 and ets-2 (PEA3-wt and PEA3-null, respectively) [1] and double stranded oligonucleotides known to interact predominantly with homo- and heterodimers of Stat1 and Stat3 [the high-affinity c-sis-inducible element (SIE) m67] [2] or Stat5 isoforms [the PRL response element (PRE) of the rat β -casein gene] [2], or previously shown to bind NFAT family members (the distal NFAT site of the human IL-2 promoter) [3] were employed. The sequences of these oligonucleotides (5' to 3') were:

PEA3-wt (CTAGATCGAACTTCCTGTCGAG) and (GATCCTCGAGCAGGAAGTTCGAT),
PEA3-null (CTAGATCGAACTTCTTGCTCGAG) and (GATCCTCGAGCAAGAAGTTCGAT-3),
PRE (GATCACTTCTTGAATTAAGGGA) and (GATCTCCCTTAATTCCAAGAAGT), SIE (GATCGACATTTCCCGTAAATCG) and (GATCCGATTTACGGGAAATGTC), and
NFAT (GATCGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT) and (GATCCACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCTCC).

For UV cross-linking assays, the following oligonucleotides were used: E2F-C-MYC-UV (5'-CTAGAGAGGCTTGGCGGGAAAAAGGCTCAGTG-3'), E2F-C-MYB-UV (5'-CTAGAGCAGATTTGGCGGGAGGGGGGAGGCTCAGTG-3'), and UV-common (5'-GATCCACTGAGCCT-3').

The anti-Maz polyclonal rabbit anti-serum was raised against a specific peptide and will be described in further detail elsewhere. The anti-E2F7 polyclonal antibodies MR-1 (BCN4774), MR-3 (BCN4775), and MR-5 (BCN4776) recognize E2F7-A, E2F7-B, or both isoforms, respectively, and were obtained from AntibodyBcn (Spain). The anti-all-NFAT Ab has been previously described and efficiently recognizes NFAT-1, -2, -3, and -4 members [3]. The preimmune serum was obtained from the rabbit prior to immunization.

Construction of vectors.

To generate the wild-type (wt) version of 2xc-myc BG-LUC and its mutant derivatives, the annealed 2xE2Fc-myc(wt)

(5'-CGCGTGAGGCTTGGCGGGAAAAAGAGAGGCTTGGCGGGAAAAAGAA-3' and 5'-GATCTTCTTTTCCCGCCAAGCCTCTCTTTTCCCGCCAAGCCTCA-3'), 2xE2Fc-myc(E2F), 2xE2Fc-myc(sp), or 2xE2Fc-myc(null) oligonucleotides were ligated to pBG-LUC, immediately upstream from the β -globin TATA box. For the E2F-c-myc mutants, the point-mutations indicated in Fig. 4 were employed. To generate pGL2-CMYCwt, a DNA insert encompassing the *C-MYC* P1 and P2 promoters (-274 to +66 relative to the P2 transcription start site) was subcloned from the plasmid, 157mycCAT [4], a generous gift from Ed DesJardins (University of Chicago; Chicago, IL), into pGL2-Basic. The myc-Luc mutant derivatives were generated by site-directed mutagenesis as previously described [5]. The mutations introduced are shown in figure 3C. Sequence analysis was used to confirm the presence of the appropriate mutations. To generate pE μ -CMYC, the Immunoglobulin heavy chain enhancer E μ was subcloned from the plasmid EuSV-Vector, a generous gift from Carlos Martinez-A (Centro Nacional de Biotecnologia, Madrid, Spain), directly upstream from the wt or mutant versions of the c-myc promoter into pGL2-CMYC. The E μ -CMYC promoter cassette from pE μ -CMYC wt and its mutant derivatives were transferred into pGL2-Enhancer, which contains the SV40 enhancer downstream from the luciferase cDNA, to generate pEnh-E μ -CMYC.

Chromatin immunoprecipitation assays.

For Chromatin immunoprecipitation assays, DNA was subjected to PCR using either specific primers for a C-MYC promoter region encompassing the E2F site (5'-GGCTTCTCAGAGGCTTGGCGGG-3' and 5'-GTCGGGAGAGTCGCGTCCTTGCTC-3') or primers that amplified a control product corresponding to the 3'-UTR region of the BMP7 gene (5'-GGCTTCTCCTACCCCTACAAGGCCGT-3' and 5'-CGGAGGATCCCTCCTTCCCAGTAACC-3').

FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1. EMYCS does not contain E2F6 or E2F7. (A) Binding reactions were performed using Saos-2 nuclear extracts and the E2Fc-myc probe; (B-F) the E2F1-d probe and nuclear extracts from Saos-2 cells transfected with DP1 plus E2F6 (+) or empty vector (-) (B); E2F7-A (+) or empty vector (-) (C); E2F7-B (+) (D); E2F7-A (E); or E2F7-B (F). Extracts were pre-incubated in the absence (None), or in the presence of the indicated Abs for 20 min. prior to addition of the labeled probes. A combination of Abs MR-1 (E2F7-A), MR-3 (E2F7-B), and MR-5 (E2F7-A and E2F7-B) was used in panel (A). The anti-Maz Ab was used as a negative control. Arrows point to EMYCS- (A), E2F6- (B), or E2F7-containing complexes (C-F), whereas arrowheads point to super-shifted complexes.

Supplementary Figure 2. Abs against E2F1 to E2F3 work well in EMSA assays. Binding reactions were performed in the absence (None), or in the presence of the indicated Abs using the E2F1-d probe and nuclear extracts from Saos-2 cells transfected with DP1 plus the indicated E2F subunits.

Supplementary Figure 3. The ets-1 and ets-2 binding probe PEA3 does not inhibit binding of EMYCS to the E2Fmyc-sp probe. Binding reactions were performed using X50-7 nuclear extracts and either PEA3-wt (A) or E2Fmyc-sp (B) probes. Reaction mixtures were pre-incubated in the absence (None), or in the presence of a 100-fold excess of the indicated unlabeled competitor oligonucleotides.

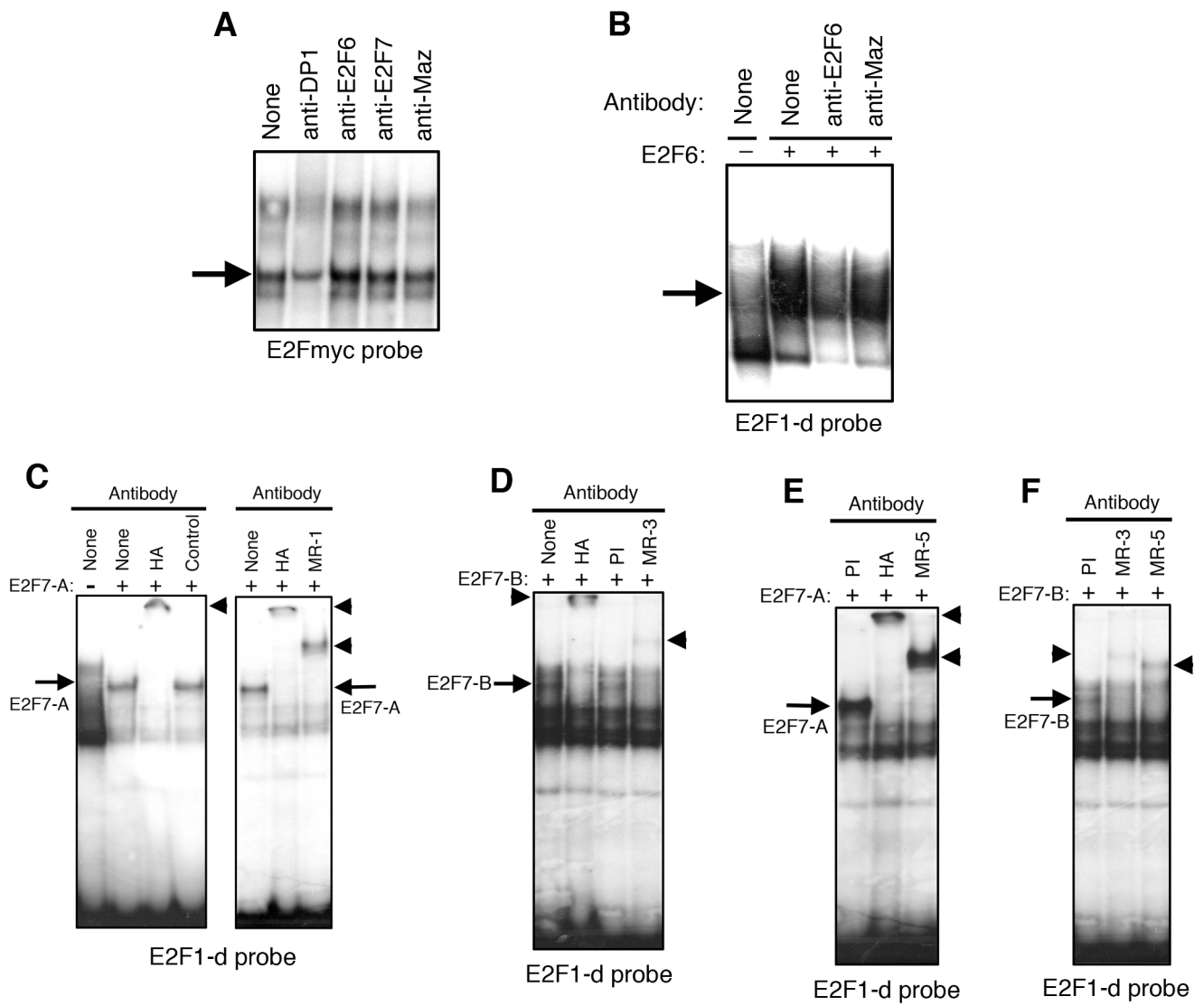
Supplementary Figure 4. EMYCS does not contain Stat3 or Stat5. Binding reactions were performed using the PRE probe, that predominantly binds Stat5 [2], and nuclear extracts from U937 cells treated (+) or not (-) 15 min. with IL-4 (A and B); the SIE

probe, that predominantly interacts with homo- and heterodimers of Stat1 and Stat3 [2], and nuclear extracts from Molt-4 cells treated 15 min. with SDF-1 (C); or nuclear extracts from Saos-2 cells and the E2Fmyc-wt probe (D) or the E2Fmyc-sp probe (E). Arrows point to Stat5- (A and B), Stat3- (C), or EMYCS-containing complexes (D and E). Reaction mixtures were pre-incubated in the absence (None) or in the presence of a 100-fold excess of the indicated unlabeled competitor oligonucleotides (A and D) or pre-incubated in the absence (None), or in the presence of Abs against the indicated proteins for 20 min. prior to addition of the labeled probes (B, C, and E). The anti-Maz Ab was used as a negative control.

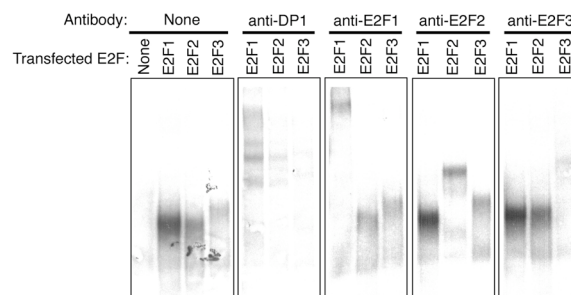
Supplementary Figure 5. NFAT family members are not present in EMYCS. Binding reactions were performed using X50-7 nuclear extracts and either NFAT (A) E2Fmyc-wt (A and B), or E2Fmyc-sp (B) probes. (A) Extracts were pre-incubated for 20 min. prior to addition of the labeled probes in the absence (None), or in the presence of an Ab that recognizes the DNA-binding domain of all NFAT family members or the corresponding pre-immune serum (Control). (B) Reaction mixtures were pre-incubated in the absence (None), or in the presence of a 100-fold excess of the indicated E2Fmyc unlabeled competitor oligonucleotides or in the presence of a 25-fold (25x) or a 100-fold (100x) excess of unlabeled NFAT competitor oligonucleotide (B). Arrows and arrowheads point to NFAT- and EMYCS-containing complexes, respectively.

REFERENCES

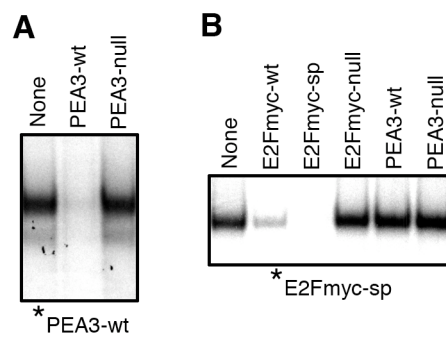
1. Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. and Stehelin, D. (1990) The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature*, 346, 191-3.
2. Ooi, G.T., Hurst, K.R., Poy, M.N., Rechler, M.M. and Boisclair, Y.R. (1998) Binding of STAT5a and STAT5b to a single element resembling a gamma-interferon-activated sequence mediates the growth hormone induction of the mouse acid-labile subunit promoter in liver cells. *Mol Endocrinol*, 12, 675-87.
3. Iniguez, M.A., Martinez-Martinez, S., Punzon, C., Redondo, J.M. and Fresno, M. (2000) An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, 275, 23627-35.
4. DesJardins, E. and Hay, N. (1993) Repeated CT elements bound by Zinc Finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoters. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 5710-5724.
5. Campanero, M.R., Armstrong, M. and Flemington, E. (1999) Distinct cellular factors regulate the c-myc promoter through its E2F element. *Mol Cell Biol*, 19, 8442-50.



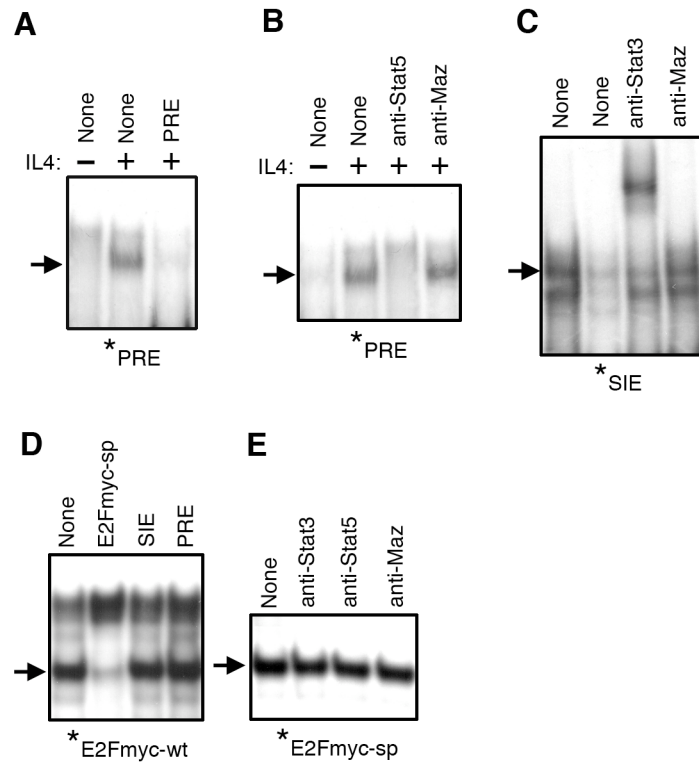
Alvaro-Blanco, et al., Supplementary Figure 1



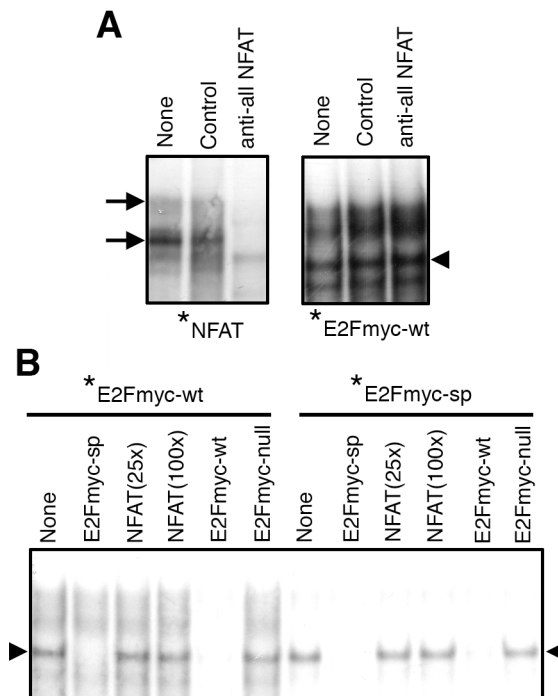
Alvaro-Blanco, et al., Supplementary Figure 2



Alvaro-Blanco, et al., Supplementary Figure 3



Alvaro-Blanco, et al., Supplementary Figure 4



Alvaro-Blanco, et al., Supplementary Figure 5